

**Beobachtungen am elektrischen
Oberflächenpotential von Erythrozyten,
nach Einwirkung von Neuraminidase und
Anti-Neuraminidase-Seren**

Roland Gsell

1974

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der Kinderklinik der Universität des Saarlandes

Direktor: Professor Dr. med. J.B.Mayer

Beobachtungen am elektrischen Oberflächenpotential
von Erythrozyten, nach Einwirkung von Neuramini-
dase und Anti-Neuraminidase-Seren

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

R o l a n d G s e l l

aus

D i l l i n g e n

Jahr

1 9 7 3

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: ..Prof. Dr. P. Sachtleben.....

Mitberichterstatter: ..Prof. Dr. H. Spiess.....

Dekan: ..Prof. Dr. W. Spann.....

Tag der mündlichen Prüfung: ..5. Februar 1974.....



Beobachtungen am elektrischen Oberflächenpotential
von Erythrozyten, nach Einwirkung von Neuraminidase
und Anti-Neuraminidase-Seren

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG.....	8
II. MATERIALIEN UND METHODEN.....	15
MATERIALIEN.....	15
A. Neuraminidase.....	15
B. Synthetische N-Acetylneuraminsäure (NANA).....	16
C. Humanerythrozyten.....	16
D. Pufferlösung.....	16
E. Antiseren.....	17
F. Normales Kaninchenserum.....	18
METHODEN.....	18
A. Zellelektrophorese.....	18
1. Physikalische Grundlagen.....	19
2. Methodik der Zellelektrophorese.....	20
3. Meßtechnik.....	21
B. Neuraminsäurebestimmung.....	22
1. Bestimmung der NANA nach der Thiobarbitur- säuremethode.....	23
a) Reagenzien.....	23
b) Herstellung der Reagenzien.....	23
c) Entwicklung des Farbstoffes.....	24
2. Bestimmung der Eichkurve.....	26
a) Standardlösungen.....	26
b) Standardansätze.....	27
c) Bestimmung der Eichkurve.....	27
3. Rechnerische Grundlagen der NANA-Bestimmung..	30
a) Molekulargewicht von NANA.....	30
b) Berechnung der NANA in Mol/Liter.....	30
c) Berechnung des allgemeinen molaren Ex- tinktionskoeffizienten nach dem Beer'schen Gesetz.....	31
d) Die Ermittlung des NANA-Gehaltes in Über- ständen fermentierter Erythrozyten- suspensionen.....	32

Bestimmung der unkorrigierten NANA-Menge...	32
Berechnung der korrigierten NANA-Menge.....	33
NANA-Bestimmung bei Anwesenheit von Serum in den Proben.....	34
e) Fehlerbreite der Methode.....	35
III. ERGEBNISSE.....	37
TEIL I: Vorversuche.....	37
A. Die elektrophoretische Beweglichkeit von Human- erythrozyten.....	37
B. Wirkung von Neuraminidase auf die Wanderungsge- schwindigkeit von Humanerythrozyten.....	37
1. Herstellung der Neuraminidaseverdünnungen.....	38
2. Herstellung der Erythrozytensuspensionen.....	39
3. Versuchsansatz und Meßergebnisse.....	39
C. Abspaltung von NANA in Abhängigkeit von Neura- minidasekonzentration und fermentierter Ery- throzytenmenge.....	41
1. Einfluß der Neuraminidasekonzentration auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Humanery- throzyten.....	45
2. Einfluß der Neuraminidasekonzentration auf die Menge der abgespaltenen NANA.....	45
3. Einfluß der Substratkonzentration auf die Menge der abgespaltenen NANA.....	47
4. Verminderung der Zellwanderungsgeschwindigkeit in Relation zur Menge der abgespaltenen NANA..	48
TEIL II: Hauptversuche.....	51
A. Die Wirkung von Anti-RDE auf RDE-behandelte Erythrozyten.....	53
1. Versuchsanordnung.....	53
a) Material.....	53
b) Versuchsgang.....	53
2. Versuchsprotokolle und Ergebnisse.....	54
a) Versuch 1.....	54
b) Versuch 2.....	56

c) Versuch 3.....	58
d) Versuch 4.....	60
e) Versuch 5.....	61
B. Die Wirkung von Anti-RDE auf gelöste RDE.....	67
1. Versuchsanordnung.....	67
a) Material.....	67
b) Versuchsgang.....	67
2. Versuchsprotokolle und Ergebnisse.....	68
a) Versuch 6.....	68
b) Versuch 7.....	70
c) Versuch 8.....	72
d) Versuch 9.....	74
IV. DISKUSSION.....	79
V. ZUSAMMENFASSUNG.....	84
VI. Literaturverzeichnis.....	85

Lebenslauf

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Bedeutung, die der Zelle als kleinster Funktionseinheit im Gesamtorganismus zukommt, haben die Forschungen der letzten Jahrzehnte verdeutlicht. Insbesondere wurde offenkundig, welche zentrale Rolle die Zellmembran beim Stoffwechsel zwischen Extra- und Intrazellulärraum spielt. Zahlreiche Eigenschaften der Membran konnten mit Hilfe biochemischer, physiologischer und elektronenoptischer Verfahren gefunden werden. Während die Masse der Untersuchungen und Erkenntnisse den Membranquerschnitt und seine Permeabilität betrifft, haben einige Untersuchungen besonders virologische und immunologische sich mit der äußeren Oberfläche der Zelle befaßt. Mit der Entwicklung der Zellelektrophorese entstand eine weitere Methode mit deren Hilfe Phänomene der Zellmembranoberfläche erkannt und mit den Ergebnissen anderer Untersuchungsarten verglichen werden konnten.

Die verschiedensten Zellarten waren bereits Untersuchungsobjekte der Zellelektrophorese, so zum Beispiel Erythrozyten, Leberzellen, Hefezellen, Tumorzellen und Sperma. Am meisten bevorzugt waren jedoch die roten Blutzellen, da deren Oberflächenmembranen wegen ihrer

leichten Zugänglichkeit relativ günstige Untersuchungsbedingungen bieten. Wesentliche Ergebnisse konnten in diesem Zusammenhang durch die Verwendung von Viren erzielt werden, insbesondere aus der Gruppe der Myxoviren, zu denen unter anderen das Virus der Mumps, der New-Castle-Disease, die Viren der Influenza-Gruppe, so auch das Virus der klassischen Geflügelpest gehören. Dies hat seine Ursache darin, daß Viren einmal definierte, elektronenoptisch sichtbare Gebilde darstellen, deren physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften bereits eingehend untersucht worden sind, und daß zum anderen über ihre Beziehung zu den komplementären, determinierenden Gruppen an der Zelloberfläche speziellere Kenntnisse bestehen. Von diesen wiederum am genauesten untersucht sind die dem Viruspartikel komplementären Gruppen, die sogenannten Virusrezeptoren.

Grundlegende Beobachtungen über den sogenannten Virusrezeptor stammen von HIRST (9,10,11), dem Entdecker der virusbedingten Hämagglutination. Er stellte fest, daß Erythrozyten unter der Einwirkung von Viren agglutinieren, wobei Viren an die Zellwand adsorbiert werden. Nach einiger Zeit zerfallen die lockeren Agglutinate, wonach die Erythrozyten durch neu hinzugesetztes Virus nicht mehr agglutiniert werden können. Der sogenannte

Virusrezeptor muß also eine Umwandlung erfahren haben, er ist inaktiviert worden. Nach dieser Inaktivierung löst sich das Virus von der Zelloberfläche (Elution) und kann dann erneut an unveränderten Rezeptoren die gleichen Erscheinungen hervorrufen. Da für diese Vorgänge der Adsorption und Elution eine starke Temperaturabhängigkeit besteht, wurden die Veränderungen am Virusrezeptor als Ausdruck einer fermentativen Tätigkeit im Sinne einer chemischen Umwandlung des Rezeptors aufgefaßt. BURNET und Mitarbeiter (3,4) konnten feststellen, daß in Kulturfiltraten von *Vibrio Cholerae* eine fermentartige Substanz enthalten ist, die das virusbindende Rezeptorsubstrat menschlicher und tierischer Erythrozyten in der gleichen Weise zu verändern vermag, wie es bei der Einwirkung von nativem Virus aus der obengenannten Gruppe der Myxoviren auf Erythrozyten beobachtet wurde. Ihrer Wirkung entsprechend nannte man diese Substanz "receptor-destroying-enzyme" oder abgekürzt RDE.

KLENK et al. (13,14) und FAILLARD (12) wiesen nach, daß bei der Einwirkung von RDE und aktivem Virus auf Erythrozyten durch enzymatische Aktivität N-Acetylneuraminsäure abgespalten wird. Dies geschieht auf dem Wege der Spaltung einer O-glycosidischen Bindung (KLENK und UHLENBRUCK (15)). Hieraus durfte man schließen, daß die

Virusrezeptoren der Membranoberfläche endständig N-Acetylneuraminsäure enthalten. Somit ließ sich RDE als ein neuraminsäureabspaltendes Ferment, als eine Neuraminidase bezeichnen und die Viruswirkung im Sinne einer neuraminidaseähnlichen Aktivität deuten. Da Neuraminsäure unter physiologischen Bedingungen eine dissoziierte Carboxylgruppe besitzt, wird mit jedem Molekül abgespaltener Neuraminsäure eine elektrische Elementarladung von der Zelloberfläche entfernt.

Bei der zellelektrophoretischen Untersuchung von Zellen, die der Einwirkung von aktivem Virus bzw. RDE ausgesetzt waren, konnte eine Verminderung des negativen Oberflächenpotentials der Zellmembran festgestellt werden, die sich in einer Verminderung der Wanderungsgeschwindigkeit der Zellen im elektrischen Feld ausdrückte (PIPER (17)). Nach Untersuchungen von HANIG (8), ADA und STONE (1), SACHTLEBEN (20) u.a. kann die Zelloberflächenladung durch Virus um etwa 50 % reduziert werden. Die Deutung dieser Befunde erfolgte zwanglos in der Weise, daß man den Verlust des Oberflächenpotentials auf den Verlust von negativen Elementarladungen durch Abspaltung von Neuraminsäure zurückgeführt hatte. Diese Theorie der Abspaltung ist heute allgemein in Gebrauch. Verminderungen der Wanderungsgeschwindigkeit von biologischem Material, also

meist von einzeln auspendierten Zellen verschiedenster Herkunft werden, wenn sie durch Behandlung mit Neuraminidase erfolgt sind, ohne weiteres auf die Abspaltung von Neuraminidase bezogen. Hiergegen sprechen aber verschiedene Befunde. So kann zum Beispiel mit RDE eine noch weitergehende Entladung gefunden werden.

Bemerkenswert in diesem Zusammenhang sind auch Berechnungen von COOK und Mitarb. (6), die die durch Virus bzw. RDE von der Membranoberfläche abgespaltenen N-Acetylneuraminsäuremengen in Relation zur zell-elektrophoretisch meßbaren Erniedrigung des Oberflächenpotentials setzten. Es zeigte sich, daß durch RDE mindestens doppelt soviel chemisch nachweisbare Neuraminsäure abgespalten wird, als aufgrund der Potentialverminderung der Zellen berechnet worden war. Andere Autoren fanden eine im Verhältnis zur Entladung noch viel höhere Abspaltung von Neuraminsäure (RUHENSTROTH-BAUER et al. (18). Dies bedeutet, daß die Abspaltung von Neuraminsäure wenigstens zum Teil ohne elektrokinetische Auswirkungen bleibt und demnach darf die Ursache der Potentialverminderung nicht mehr ausschließlich in der Neuraminsäureabspaltung gesehen werden.

STRAUB und SACHTLEBEN (23) führten eine vergleichende Untersuchung der Wirkungskinetik von RDE und Myxovirus durch mit Hühnererythrozyten als Substrat. Es war bekannt, daß aktive Viruspartikel unter stetigem Wechsel von Adsorption und Elution solange von einem Rezeptor zum anderen wandern, bis alle Rezeptoren fermentativ verändert sind, das Virus keinen Anheftungsplatz mehr findet und nun endgültig im Suspensionsmedium verbleibt (BUZELL und HANIG (5)). Aufgrund dieses Vorganges ist die Viruswirkung unabhängig von der Dosis. Unterschiedliche Virusmengen führen somit immer zu dem gleichen Ergebnis: die Entfernung aller Rezeptoren von der Zelloberfläche, was bei Hühnererythrozyten elektrophoretisch zu einer Verminderung der Zellbeweglichkeit von 55 % führt. Da RDE eine Übereinstimmung mit aktivem Virus zugeschrieben wird, waren hier ähnliche Verhältnisse zu erwarten. STRAUB und SACHTLEBEN (24) konnten jedoch nachweisen, daß nach stattgehabter Adsorption von RDE an die Zellwand eine Elution offensichtlich nicht mehr auftritt. Das RDE-Molekül mußte also mehr oder weniger fest an seinen Angriffsort gebunden worden sein, denn die elektrokinetischen Wirkungen standen im Gegensatz zu aktivem Virus in eindeutiger Abhängigkeit von der zugesetzten RDE-Dosis. Diese Eigenschaft hat RDE mit inaktiviertem Virus gemeinsam, dem gleichfalls die Fähigkeit zu spontaner Elution fehlt. Es

wurde weiterhin festgestellt, daß RDE sich nicht quantitativ an die angebotenen Erythrozyten adsorbiert, sondern nach Maßgabe eines Dissoziationsgleichgewichtes zwischen zellgebundener und freier RDE-Phase, das von der Dosis des RDE unabhängig ist.

Durch diese Sachverhalte erhebt sich folgende Frage: ist die Minderung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Erythrozyten ursächlich hervorgerufen durch die Abspaltung von Neuraminsäure oder beruht sie auf einem anderen Mechanismus, wie dem von STRAUB und SACHTLEBEN (23,24) diskutierten "Überdecken" von Elementarladungen durch adsorbierte RDE- bzw. inaktivierte Viruspartikel, wobei der Abspaltung von Neuraminsäure keine ausschließliche elektrokinetische Bedeutung zukäme.

Der Untersuchung dieser Frage gilt die vorliegende Arbeit. Wenn RDE-Partikel noch tatsächlich an der Zelloberfläche adsorbiert sind, so sollten sie durch Antiseren gegen RDE unter Umständen dort nachweisbar werden. Es war deshalb unser Ziel, solche Antiseren herzustellen und sie unter geeigneten Bedingungen mit Zellen zur Reaktion zu bringen, wobei gleichzeitig eine Bestimmung von Neuraminsäure in den Überständen erfolgen sollte.

II. MATERIALIEN UND METHODEN

MATERIALIEN

A. Neuraminidase (hochgereinigtes Receptor destroying enzyme = RDE)

Bei diesem Präparat handelt es sich um das in gelöster Form vorliegende, hochgereinigte RDE der Behring-Werke. Es stellt eine aus Kulturfiltraten von *Vibrio cholerae* isolierte Substanz dar, die N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure) abzuspalten vermag. Bei der Reinigung der Neuraminidase wurde besonders auf die Abtrennung proteolytisch wirksamer Fermente sowie solcher mit Aldolasewirkung und Lecithinase C-Wirkung Wert gelegt. Als Lösungsmittel für die Neuraminidase dient ein 0,05 m Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH 5,5) mit einem Zusatz von 0,9g/dl NaCl und 0,1g/dl CaCl_2 . Neuraminidase liegt in Ampullenform vor. Eine dieser Ampullen enthält 500 IE Neuraminidase in 1 ml Lösungsmittel. Wird Neuraminidase in Pufferlösung von einem pH zwischen 7,15 und 7,30 aufgenommen, so ist sie bei Kühlschranktemperatur von 4 Grad C nicht stabil und muß daher sofort verwendet werden.

B. Synthetische N-Acetylneuraminsäure (NANA = N-Acetyl-Neuraminic-Acid)

Acetylneuraminsäure reinst, 99%, synthetisch 20 mg
(Fa. Serva) Kat.-Nr. 10465

C. Humanerythrozyten

Die verwendeten Erythrozyten stammten ausnahmslos von dem gleichen gesunden Freiwilligen (Blutgruppe O, Rh). Sie wurden unter antiseptischen Verhältnissen mittels steriler Blutlanzette aus der Fingerbeere gewonnen und zunächst in Pufferlösung aufgenommen. Danach erfolgte dreimaliges Waschen in isotonischer Kochsalzlösung und Verdünnung mit isotonischer Pufferlösung auf die gewünschten Konzentrationen. Anschließend wurden die Erythrozytensuspensionen sofort für die Versuche weiterverwendet, Suspensionen, die älter als 10 Stunden waren, wurde nicht mehr benutzt.

D. Pufferlösung

Geringgradige Verschiebungen des pH-Wertes im Suspensionsmedium verändern die elektrokinetischen Eigenschaften der Erythrozytenoberfläche. Dieser Sachverhalt erfordert das Arbeiten mit gepufferten Salzlösungen.

Als Pufferlösung diente eine 0,9% Kochsalzlösung, der 5 Vol.-Prozent m/15 Phosphatpuffer, bestehend aus $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 80% und KH_2PO_4 20%, zugesetzt waren (künftig kurz als Pufferlösung bezeichnet). Der pH-Wert der Lösung lag zwischen 7,15 und 7,30, ihr elektrischer Widerstand zwischen 72 und 75 Ohm/cm bei $23^\circ \text{C} \pm 0,1^\circ \text{C}$.

E. Antiseren

Die für unsere Versuche erforderlichen Seren gewannen wir, indem wir Kaninchen Neuraminidase in unterschiedlicher Konzentration injizierten. Im einzelnen gingen wir dabei folgendermaßen vor: Aus insgesamt zwölf Kaninchen wurden vier Dreiergruppen gebildet, von denen die erste Gruppe 75 E Neuraminidase pro dosi und Tier erhielt, die zweite Gruppe 150 E, die dritte Gruppe 250 E, die vierte Gruppe 500 E. Die Injektionslösungen stellten wir unter Verwendung des oben genannten Neuraminidasepräparates her, das in 1 ml 500 E enthält. Die Verdünnungen mittels 0,9% Kochsalzlösung wurden so eingestellt, daß die zur Allergisierung gewählten Neuraminidase-Dosen von 75 E, 150 E, 250 E und 500 E in jeweils 1 ml Injektionslösung enthalten waren.

Alle Tiere erhielten wöchentlich eine intravenöse Injektion, wobei ein Tier aus der vierten Gruppe einen Tag und ein Tier aus der dritten Gruppe fünf Tage nach der ersten Injektion starb. Die übrigen Tiere erhielten im Verlauf von 3 Monaten insgesamt 12 Injektionen. Anschließend wurden sie getötet und das Blut aus den eröffneten Halsgefäßen in sterilen Behältern aufgefangen. Nach Abzentrifugieren der festen Blutbestandteile wurden die Seren im Wasserbad bei 56°C 30 min. inaktiviert und anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

F. Normales Kaninchenserum

Das Blut aus den eröffneten Halsgefäßen eines eben getöteten, gesunden Kaninchens wurde in sterilen Gefäßen aufgefangen. Nach Abzentrifugieren der festen Blutbestandteile wurde das Serum im Wasserbad bei 56°C 30 min. inaktiviert und anschließend im Kühlschrank bis 4°C gelagert

METHODEN

A. Zellelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit soll nur kurz auf Prinzip und

Technik der Zell-Elektrophorese eingegangen werden. Ausführliche Beschreibungen dieser Methode wurden bereits gegeben. Wir verweisen auf die umfassende Arbeit von SACHTLEBEN 1962 (20).

1. Physikalische Grundlagen

Physikalische Grundlage der Elektrophorese ist die Tatsache, daß ein geladenes Partikel, wenn es sich in einem elektrischen Feld befindet, unter der Einwirkung dieses Feldes in Bewegung gerät. Die Geschwindigkeit der Bewegung ist der Größe der Ladung proportional. Bezogen auf eine konstante, definierte Feldstärke und ein Suspensionsmedium mit konstanter definierter Viskosität ist die Geschwindigkeit "v" des Partikels ein relatives Maß für die Größe seiner Oberflächenladung. Die Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeit "v" erfolgt nach der Formel:

$$v = \frac{\frac{l}{t} \cdot \frac{I}{R}}{q} \quad \left[\frac{\mu / \text{sec}}{\text{Amp.} \cdot \Omega / \text{cm}} \right]$$

wobei $l [\mu]$ die Wanderungsstrecke des Partikels, $t [\text{sec}]$ die dafür benötigte Zeit, $I [\text{Amp.}]$ die angelegte Stromstärke, $R [\Omega]$ den elektrischen Widerstand des Suspensionsmedium und $q [\text{cm}]$ die Tiefe oder den Querschnitt der verwendeten Elektrophoresekammer dar-

stellen. Für die Anwendung dieser Formel ist ein konstant visköses Suspensionsmedium Voraussetzung.

2. Methodik der Zellelektrophorese

Das Verfahren beruht auf der Messung der Wanderungsgeschwindigkeiten einzelner suspendierte Zellen im elektrischen Feld. Die Zellen befinden sich dabei in einer rechtwinkligen, waagrecht angeordneten Meßkammer aus Glas und werden durch ein Mikroskop beobachtet. Das elektrische Feld wird durch seitlich an die Kammer angelegte Silberchloridelektroden erzeugt, die ihren Strom über einen Transformatorgleichrichter, Stromunterbrecher und Stromwender aus dem 220 V Stromnetz erhalten. Zur Vermeidung von Temperaturschwankungen, die die Meßergebnisse beeinflussen, wurde die Meßkammer durch einen thermostatregulierten Wassermantel konstant bei einer Temperatur von $23^{\circ} \text{C} \pm 0,1^{\circ} \text{C}$ gehalten. Zur eigentlichen Messung wird das Untersuchungsgut, in geeignetem Medium suspendierte Zellen, mittels einer 2 ml Rekordspritze mit abgewinkelter Kanüle seitlich in die Kammer eingebracht. Die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit erfolgt mit Hilfe einer Stoppuhr in Relation zu einem geeichten Okular-Meßgitter. Nach abgeschlossener Messung muß die Kammer gereinigt werden, wobei Aqua dest.

Alkohol und Äther mittels einer Wasserstrahlpumpe durch die Kammer gesaugt werden.

3. Meßtechnik

Die richtige Einstellung und Fehlerfreiheit der Elektrophoreseapparatur wurde vor jeder Meßreihe mit frisch suspendierten Humanerythrozyten geprüft. Die im Kapitel "Ergebnisse" angegebenen Werte stellen jeweils einen Mittelwert dar, der aus mindestens 10 Einzelmessungen errechnet wurde. Je nach Streubreite der einzelnen Werte erhöhte sich die Zahl der Messungen auf 20 bis 50.

B. Neuraminsäurebestimmung

Die Sialinsäuren sind Bestandteile der weitverbreiteten Sialomucoide (Glycoproteide). Durch saure Hydrolyse oder spezifischer durch Spaltung der ketoglycosidischen Bindung mittels Neuraminidase können sie von diesen Komplexen abgetrennt werden.

Zum quantitativen Nachweis der Sialinsäuren wurden verschiedene Methoden entwickelt, die auf der Anwendung von erhitzten, starken Säuren beruhen, so daß eine Trennung der freien, gelösten Sialinsäuren von den zellständig gebundenen Sialinsäuren nicht möglich ist (Sammlung der Methoden siehe bei MANTEL (16)). Speziell für die Unterscheidung wurden weitere Techniken zur Bestimmung der N-Acetylneuraminsäure entwickelt: Thiobarbitursäuremethode und Alkali-Ehrlich-Methode (AMINOFF, 1961 (2), Modifikation der Thiobarbitursäuremethode (WARREN, 1959 (25)).

Beide Methoden erfordern die Bestimmung einer Eichkurve durch Messungen aus Standardansätzen mit bekannten Neuraminsäuremengen und die Berechnung der molaren Extinktionskoeffizienten nach dem Beerschen Gesetz. Anhand der photometrisch bestimmten Extinktionen können die Neuraminsäuremengen unmittelbar aus den Eichkurven abgelesen oder mit Hilfe der molaren

Extinktionskoeffizienten berechnet werden. Wir verwendeten bei unseren Versuchen ausschließlich die Thiobarbitursäure-Methode in Anlehnung an die Ausführungen von D. AMINOFF (2). Die Standardlösungen zur Bestimmung der Eichkurve wurden mit einem synthetischen N-Acetylneuraminsäurepräparat hergestellt.

1. Bestimmung der N-Acetylneuraminsäure nach der Thiobarbitursäure-Methode

a.) Reagenzien

- a. Perjodat: 25 mM-Perjodsäure in 0,125 N H_2SO_4 (pH 1,2)
- b. Natriumarsenit: 2% Lösung von Natriumarsenit in 0,5 N HCL
- c. Thiobarbitursäure: 0,1 M Lösung von 2-Thiobarbitursäure in Wasser, mit NaOH auf einen pH von 9,0 eingestellt. Die Lösung ist in einer dunklen Flasche maximal einen Monat haltbar bei 4 Grad C. Nicht mehr brauchbare Lösungen zeigen einen Anstieg des pH.
- d. Saures Butanol: Butanol-1, 5% (v/v) 12 N HCL enthaltend.

b.) Herstellung der Reagenzien

Für die Versuchsreihen wurden 50ml Perjodatlösung (Lösung a), 50ml Natriumarsenitlösung (Lösung b), 500 ml Thiobarbitursäurelösung (Lösung c), und 1000 ml saures Butanol (Lösung d) hergestellt.

- 50 ml Lösung a: 285 mg Perjodsäure krist. p.A.
(Merck Nr. 524) werden mit 6,3 ml
1 N H_2SO_4 versetzt und mit Aqua dest.
auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt.
- 50 ml Lösung b: 1 g reines Natriumarsenit (Riedel
Nr. 11334) wird mit 25 ml 1 N HCL ver-
setzt und mit Aqua dest. auf ein Vo-
lumen von 50 ml aufgefüllt.
- 500 ml Lösung c: 7,2 g Thiobarbitursäure (Fa. Serva,
Nr. 36108) werden in Aqua dest. ge-
löst, mit starker NaOH auf einen pH
von 9,0 eingestellt und mit destillier-
tem Wasser auf ein Volumen von 500 ml
aufgefüllt. Die Lösung wird in einer
braunen Flasche im Kühlschrank bei
4 Grad C aufbewahrt. Die Haltbarkeit
beträgt dann etwa einen Monat.
- 1000 ml Lösung d: 950 ml n-Butanol werden mit 50 ml HCL
konz. versetzt.

c.) Entwicklung des Farbstoffes

Jeweils 0,5 ml der zu untersuchenden Proben -
Standardansätze mit synthetischer N-Acetylneuramin-
säure zur Bestimmung der Eichkurven bzw. Bestimmungs-
ansätze aus Überständen der mit Neuraminidase fermen-
tierten Erythrozytensuspensionen - wurden in mittels
Glasstopfen verschließbare Reagenzgläser ein-

pipettiert, mit jeweils 0,25 ml Perjodat-Reagens versetzt und 30 Minuten lang in einem Wasserbad bei 37 Grad C aufbewahrt (in den Proben vorhandene N-Acetylneuraminsäure wird dabei oxydiert). Das überschüssige Perjodat wurde anschließend mit 0,2 ml Natriumarsenit reduziert. Sobald die gelbe Farbe des freigesetzten Jods verschwunden war (nach etwa 1 - 2 Minuten), setzten wir 2 ml Thiobarbitursäurereagens zu und erhitzen die Proben im verschlossenen Reagenzglas 7,5 Minuten im kochenden Wasserbad. Die darauf in Eiswasser gekühlten Lösungen wurden mit 5 ml saurem Butanol geschüttelt und die beiden Phasen anschließend durch kurzes schnelles Zentrifugieren getrennt. Die jetzt den Farbstoff enthaltenden oberliegenden Butanolschichten pipettierten wir in Glasküvetten (Schichtdicke 1 cm) ab und ermittelten die erhaltenen Farbinintensitäten sofort in einem Spektralphotometer (Beckmann Model DU) bei einer Wellenlänge von 549 m μ und 532 m μ . Auch bei augenscheinlicher Entfärbung der violetten Butanolschichten können die Extinktionen über zwei Stunden als konstant betrachtet werden (MANTEL (16)).

Die gemessenen Extinktionen sind den N-Acetylneuraminsäurekonzentrationen direkt proportional, so daß sich die aus Standardsätzen ermittelten Eichkurven als Geraden darstellen. Der molare Extinktionskoeffizient bei einer

Wellenlänge von 549 m μ beträgt nach D. AMINOFF (2) 70,7 . 10³; nach J. WARREN (25) 57 . 10³ (eigene Modifikation der Thiobarbitursäure-Methode) und nach G.F. FUHRMANN (7) 73,4 . 10³.

2. Bestimmung der Eichkurve für N-Acetylneuraminsäure aus Standardansätzen

a.) Standardlösungen

Zur Herstellung der Standardlösungen wurde die bei ca. -20 Grad in der Tiefkühltruhe gelagerte synthetische N-Acetylneuraminsäure zur Adaptation in Zimmertemperatur längere Zeit stehengelassen. Dann wurden die benötigten Mengen mittels einer Analysenwaage gewägt und mit Aqua dest. auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Die Verwendung der N-Acetylneuraminsäure sofort nach Entnahme aus der Kühltruhe ist nicht zulässig, da Feuchtigkeitsniederschläge an der unterkühlten Substanz die Wägungen verfälschen würden.

Zur Bestimmung der Eichkurve stellten wir zwei Standardlösungen her:

Standardlösung I: 10 mg NANA mit Aqua dest. auf
ein Volumen von 50 ml aufgefüllt.

Standardlösung II: der Inhalt eines Original-
fläschchens, das nach Hersteller-
angabe 20 mg enthielt, wurde ohne
Nachwägen mit Aqua dest auf ein Vo-
lumen von 100 ml aufgefüllt.

Beide Standardlösungen waren so eingestellt, daß in 0,05 ml Lösung 10 µg NANA enthalten sein sollten ($1 \text{ g} = 10^6 \text{ µg}$).

b.) Standardansätze

Unter Verwendung der Standardlösungen stellten wir Standardansätze von jeweils 0,5 ml her, die NANA in steigenden Mengen enthielten.

5 µg NANA: 0,025 ml Standardlösung + 0,475 ml Aqua dest.			
10 µg "	: 0,050 ml "	+ 0,450 ml "	"
20 µg "	: 0,100 ml "	+ 0,400 ml "	"
30 µg "	: 0,150 ml "	+ 0,350 ml "	"
40 µg "	: 0,200 ml "	+ 0,300 ml "	"
50 µg "	: 0,250 ml "	+ 0,250 ml "	"

Von Standardlösung I und II wurden Standardansätze in der obengenannten Weise in jeweils dreifacher Ausführung erstellt, um einen Hinweis auf die Größe des Pipettierfehlers und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhalten.

c.) Bestimmung der Eichkurve

Zur Bestimmung der Eichkurve wurden Standardansätze von jeweils 0,5 ml, die N-Acetylneuraminsäure in steigenden Mengen enthielten, der Thiobarbitursäuremethode zugeführt. Mit dieser Methode werden NANA-Mengen bis

etwa 50 μg erfaßt, so daß sie sich gerade zur Bestimmung kleinerer Quantitäten eignet. Die hierbei erhaltenen Farbintensitäten wurden unmittelbar darauf spektralphotometisch untersucht und die Extinktionen bei Wellenlängen von 549 $m\mu$ gemessen.

Tabelle I (Abb. 1)

Extinktionen bei 549 $m\mu$

Standardlösung I (10mg/50ml)				Standardlösung II (20mg/100ml)		
NANA	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 1	Serie 2	Serie 3
5 μg	0.333	0.221	0.203	0.273	0.270	0.275
10 μg	0.455	0.395	0.462	0.470	0.472	0.512
20 μg	0.872	0.800	0.872	0.902	0.890	0.890
30 μg	1.250	1.270	1.300	1.320	1.300	1.300
40 μg	1.620	1.620	1.630	1.650	1.650	1.660
50 μg	1.520	2.100	2.100	2.200	2.200	2.200

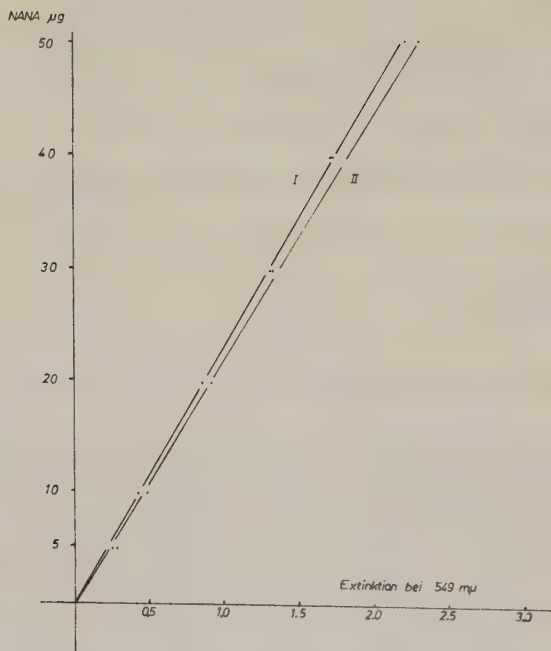
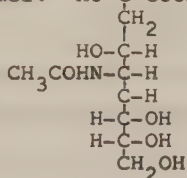


Abb.1: Eichkurve der Thiobarbitursäure-Methode,
Standardansätze aus Standardlösungen (Tab. I)

3. Rechnerische Grundlage der Neuraminsäurebestimmung

a.) Molekulargewicht von N-Acetylneuraminsäure

Strukturformel: $\text{HO}-\text{C}-\text{COOH}$



Summenformel: $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{O}_9\text{N}$

Atomgewichte: H = 1,008

O = 16,000

C = 12,011

N = 14,008

("Wissenschaftliche
Tabellen Geigy")

Molekulargewicht NANA: = 309,281

molare Lösung NANA: 1 Mol/l = 309,281 g NANA/l

b.) Berechnung der NANA in Mol/l

Bei der Thiobarbitursäure-Methode werden spektral-photometrisch gemessen die in einem Volumen von 5 ml Butanol enthaltenen μg NANA. Zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten ist jedoch die Umrechnung von μg NANA/ 5 ml in Mol/l NANA erforderlich.

309,281 g/l NANA = 1 Mol/l NANA

$$1 \mu\text{g}/5 \text{ ml NANA} = \frac{10^3}{5 \cdot 10^6 \cdot 309,281} \text{ Mol/l NANA}$$

$$1 \mu\text{g}/5 \text{ ml NANA} = \frac{1}{15,464 \cdot 10^5} \text{ Mol/l NANA}$$

$$a \mu\text{g}/5 \text{ ml NANA} = \frac{a}{15,464 \cdot 10^5} \text{ Mol/l NANA}$$

c.) Berechnung des allgemeinen molaren Extinktions-
koeffizienten nach dem Beerschen Gesetz

Nach dem Beerschen Gesetz gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot s$$

der molare Extinktionskoeffizient errechnet sich als:

$$\varepsilon = \frac{E}{c \cdot s} \quad \left[\frac{1}{\text{Mol} \cdot \text{cm}} \right]$$

Zeichenerklärung:

E = absolute Extinktion (dimensionslos)

c = Konzentration = NANA-Menge/Volumen (Mol/l)

s = Schichtdicke der photometrisch untersuchten
Flüssigkeit (cm)

ε = allgemeine molarer Extinktionskoeffizient $\frac{1}{\text{Mol} \cdot \text{cm}}$

Da die Schichtdicke bei unseren photometrischen Messungen
1 cm beträgt und die NANA-Konzentration im Bestimmungs-
ansatz sich als

$$c = \frac{\text{NANA-Menge}}{\text{Volumen}} = \frac{1}{5} a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \frac{a}{15,464 \cdot 10^5} \text{ (Mol/l)}$$

berechnet, wobei a die NANA-Menge im Bestimmungsansatz
ist, ergibt sich für den molaren Extinktionskoeffizien-
ten die Beziehung

$$\varepsilon = \frac{E \cdot 15,464 \cdot 10^5}{a} \left[\frac{1}{\text{Mol/cm}} \right]$$

$$\varepsilon \cdot 10^{-3} = \frac{E \cdot 15,464 \cdot 10^2}{a} \left[\frac{1}{\text{Mol/cm}} \right]$$

d.) Ermittlung des NANA-Gehaltes in Überständen fermentierter Erythrozytensuspensionen

Zur Bestimmung der in unseren Versuchen durch Neuraminidase abgespaltenen N-Acetylneuraminsäure verwendeten wir die Thiobarbitursäure-Methode. Dazu entnahmen wir den Überständen fermentierter Erythrozyten Volumina von 0,5 ml (in Ausnahmefällen 0,2 ml, die mit phys. NaCl-Lösung auf 0,5 ml ergänzt wurden), die dann der Methode zugeführt wurden.

α) Bestimmung der unkorrigierten NANA-Mengen

Der NANA-Gehalt der untersuchten Proben wurde aus den photometrisch gemessenen absoluten Extinktionen nach der Formel:

$$a = \frac{15,464 \cdot 10^2}{10^3} \cdot E$$

berechnet. Er kann aber außerdem unmittelbar aus der Eichkurve abgelesen werden. Die in den Proben ermittelten NANA-Mengen, die in einem Überstandvolumen von 0,5ml enthalten waren, wurden auf die Gesamtmenge des Überstandes, dem sie entnommen waren, umgerechnet. In der Regel betrug die Gesamtmenge des Überstandes 1,5 ml. Die im Kapitel "Ergebnisse" angegebenen NANA-Mengen beziehen sich ausnahmslos auf ein Volumen von 0,5 ml, das den untersuchten Proben zugrundelag. Durch diese gemeinsame Bezugsbasis ist ein direkter Vergleich der abgespaltenen NANA-Mengen auch bei unterschiedlichen Gesamtvolumina der Überstände möglich.

β) Berechnung der korrigierten NANA-Menge

Da die in unseren Proben eventuell vorhandenen Desoxy-
 oxypentosen ebenfalls mit Thiobarbitursäure zu einem
 Farbstoff reagieren, dessen Absorptionsmaximum jedoch
 bei 532 mμ liegt, wurden sie als mögliche Fehlerquelle
 ausgeschlossen, indem wir den korrigierten NANA-Gehalt
 nach der Formel (L. WARREN, 1959 (25)):

$$\mu\text{Mol NANA} = 5 \cdot \left(\frac{\epsilon_3}{\epsilon_2 \cdot \epsilon_3 - \epsilon_1 \cdot \epsilon_4} \cdot E_{549} \cdot \frac{\epsilon_4}{\epsilon_2 \cdot \epsilon_3 - \epsilon_1 \cdot \epsilon_4} \cdot E_{532} \right)$$

bestimmten.

Hierbei ist

ϵ_1 der molare Extinktionskoeffizient $\cdot 10^{-3}$ für NANA
 bei 532 mμ

ϵ_2 der molare Extinktionskoeffizient $\cdot 10^{-3}$ für NANA
 bei 549 mμ

ϵ_3 der molare Extinktionskoeffizient $\cdot 10^{-3}$ für Des-
 oxyribose
 bei 532 mμ

ϵ_4 der molare Extinktionskoeffizient $\cdot 10^{-3}$ für Des-
 oxyribose
 bei 549 mμ

Als Grundlage zur Berechnung der korrigierten NANA-Menge
 dienten die von G.F. FUHRMANN (7) angegebenen molaren
 Extinktionskoeffizienten:

$$\epsilon_1 \cdot 10^{-3} = 29,9$$

$$\epsilon_2 \cdot 10^{-3} = 73,4$$

$$\epsilon_3 \cdot 10^{-3} = 121,0$$

$$\epsilon_4 \cdot 10^{-3} = 39,8$$

Damit ergibt sich die Beziehung:

$$\mu\text{Mol NANA} = 0,079 E_{549} - 0,026 E_{532}$$

wobei 1 μMol NANA 309, 281 μg NANA ist.

8) Neuraminsäurebestimmung bei Anwesenheit von Serum
in den Proben

Voraussetzung für unsere Versuche war die Anwendung spezieller Kaninchenserum. Die Proben aus den Überständen, die auf ihren NANA-Gehalt untersucht werden sollten, enthielten daher je nach Verdünnung mehr oder weniger Serumanteile. Durch den Kochvorgang bei der Thiobarbitursäure-Methode werden diese Serumanteile denaturiert und ausgefällt. Bei dem nachfolgenden Zentrifugieren schlagen sich die Fällungsprodukte jedoch am Boden nieder, so daß die obenliegende Butanolschicht, die den Farbstoff enthält, makroskopisch ungetrübt erscheint. Die spektralphotometrischen Messungen haben allerdings gezeigt, daß der Wert der absol. Extinktion in direkter Abhängigkeit von der Menge des in der Probe enthaltenen Serum steht. D.h., die Extinktionen zeigten sich umso größer, je mehr Serum in der Probe enthalten war. Um diese Verfälschung der Messungen zu eliminieren, ließen wir bei allen Versuchen, wo mit Serum gearbeitet wurde, gleichzeitig einen entsprechenden Leerversuch mitlaufen, der in der gleichen Weise wie der Hauptversuch der Thiobarbitursäure-Methode durchgeführt wurde. Nach Subtraktion der gemessenen Extinktionen konnten wir brauchbare Meßergebnisse erhalten.

e.) Fehlerbreite der Methode

Anhand der Meßwerte zur Bestimmung der Eichkurve, s. Tab. I, kann die Fehlerbreite der Thiobarbitursäure-Methode beurteilt werden. Der Versuchsfehler setzt sich zusammen aus Wägungsfehlern bei der Herstellung der Standardansätze, Pipettierfehlern, Fehlern im Bestimmungsgang der Farbstoffbildung und Fehlern bei der spektralphotometrischen Auswertung.

Nach der Formel: $\epsilon \cdot 10^{-3} = \frac{E \cdot 15,464 \cdot 10^2}{a}$ er-

rechnete sich der molare Extinktionskoeffizient für:

Standardlösung I mit 67.5 Streubreite der Einzelwerte 14,7%

Standardlösung II mit 71.5 Streubreite der Einzelwerte 9,7%

Daraus ergibt sich bei Berücksichtigung aller Meßwerte der mittlere molare Extinktionskoeffizient von 69.4, der mittlere Fehler dieses Mittelwertes beträgt $\pm 3\%$.

Die Streubreite der Einzelwerte beläuft sich bei Umrechnung auf die NANA-Menge a auf $\pm 10,1\%$.

$\epsilon \cdot 10^{-3}$	$a = \frac{15,464 \cdot 10^2}{\epsilon \cdot 10^{-3}} \cdot E$	Streubreite der NANA-Menge a in Prozent
69.4	$a = 22.3 \cdot E$	$22.3 \cdot E = a \pm 10,1\%$

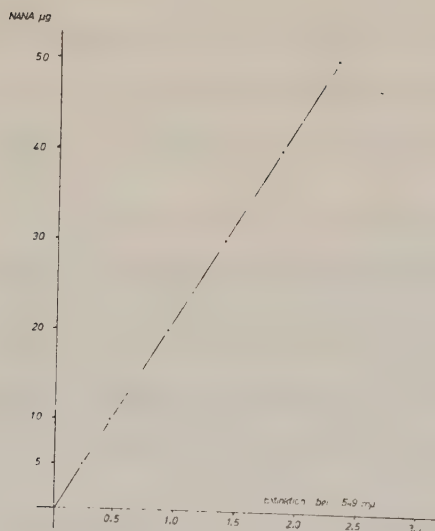


Abb. 2: Berechnete Eichkurve der Thiobarbitursäure-Methode unter Zugrundelegung unseres molaren Extinktionskoeffizienten von 69,4.

III. ERGEBNISSE

Teil I: Vorversuche

A. Die elektrophoretische Beweglichkeit von Humanerythrozyten

Die elektrophoretische Beweglichkeit von Humanerythrozyten ist unter konstanten Versuchsbedingungen konstant. Man verwendet sie deshalb schon seit einiger Zeit als Testobjekte mit denen die einwandfreie Funktion des Elektrophoresegerätes geprüft werden kann. Gleichzeitig ist es auch möglich, den vom Untersucher abhängigen individuell - subjektiven Anteil am Gesamtmeßfehler zu bestimmen. Hierzu führten wir in 40 Ansätzen 820 Einzelmessungen durch. Die mittlere Wanderungsgeschwindigkeit von Humanerythrozyten errechnete sich daraus mit 1.082

$\left[\frac{\mu \cdot \text{cm}^2}{\text{Amp} \cdot \Omega \cdot \text{sec}} \right]$. Die Standardabweichung der einzelnen Mittelwerte von diesem Durchschnittswert betrug:

$G = 0.0094$, das entspricht einem mittleren Fehler von 0,87%.

B. Wirkung von Neuraminidase auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Humanerythrozyten

Es war Voraussetzung für die späteren Hauptver-

suche, zunächst einen Anhaltspunkt über das Ausmaß der elektrophoretischen Verlangsamung von Humanerythrozyten unter der Einwirkung von Neuraminidase zu erhalten. Die Absicht der Untersuchungen bestand darin, eine geeignete Konzentration der verwendeten Neuraminidasepräparate zu ermitteln, unter deren Wirkung sich eine mittlere Verlangsamung der Erythrozyten einstellte, so daß einmal die Differenz zur Normalgeschwindigkeit genügend groß war, zum anderen nicht durch zu starke Verlangsamung der Zellen die Meßbedingungen erschwert wurden.

1. Herstellung der Neuraminidaseverdünnungen

Wir verwendeten insgesamt drei Chargen Neuraminidase mit unterschiedlichem Verfallsdatum. Aus der handelsmäßigen Ampulle zu 1 ml enthaltend 500 E Neuraminidase entnahmen wir mit einer Blutzuckerpipette (0,2 ml Pipette) 0,1 ml Lösung und füllten mit Puffer auf ein Volumen von 10 ml auf. Diese Standardlösung entsprach einer Verdünnung von 1/100 enthaltend 5 E Neuraminidase/ml. Aus ihr wurden höhere Verdünnungen von 1/1000, 1/5000 und 1/10000 hergestellt. Zur Erstellung geringerer Verdünnungen von 1/10 und 1/50 entnahmen wir der Ampulle 0,5 ml Lösung und füllten mit Puffer auf ein Volumen von 5 ml auf. Dies entsprach einer Verdünnung von 1/10, enthaltend 50 E Neuraminidase/ml. Da in Puffer gelöste Neuraminidase auch bei Lagerung

bei Temperaturen von 4°C nicht stabil ist, wurden die Verdünnungen vor jedem Versuch frisch zubereitet.

2. Herstellung der Erythrozytensuspensionen

Für jeden Versuch wurden mittels steriler Blutlanzette frisch aus der Fingerbeere entnommene Erythrozyten in Puffer aufgefangen und in phys. Kochsalzlösung dreimal gewaschen. Anschließend stellten wir eine 20% Suspension her, indem wir 1 ml Erythrozytensediment mit Puffer auf ein Volumen von 5 ml auffüllten.

3. Versuchsansatz und Meßergebnisse

Jeweils 1 ml der 20% Erythrozytensuspension wurde mit der doppelten Menge Neuraminidase unterschiedlicher Verdünnung versetzt und im Wasserbad bei 23°C 30 Minuten lang aufbewahrt. Anschließend wurden die Zellen erneut dreimal in phys. Kochsalzlösung gewaschen, mit Puffer aufgeschwemmt und der elektrophoretischen Untersuchung zugeführt.

Anhand der Versuche konnten wir feststellen, daß die einzelnen Chargen Neuraminidase mit unterschiedlichem Verfallsdatum auch unterschiedliche Wirkungen auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Erythrozyten zeigten. Es war jedoch keineswegs so, daß die Charge, die ihrem Verfallsdatum zum Zeitpunkt der Versuche am nächsten war, die geringste Verlangsamung erzeugte, vielmehr entwickelte gerade diese Charge die stärkste Aktivität. Daneben ließen sich auch Unterschiede innerhalb der gleichen Charge feststellen, so daß bei mehreren Ampullen mit gleichem Verfallsdatum

das Ausmaß der Wirksamkeit von Ampulle zu Ampulle in einem gewissen Umfang wechselte. Da die Neuraminidaseverdünnung für jeden Versuch frisch zubereitet werden mußte, war aus den genannten Gründen eine optimale, in engen Grenzen jederzeit reproduzierbare Einstellung der Erythrozytenwanderungsgeschwindigkeit mittels Neuraminidase nicht möglich. Eine Zusammenfassung der einzelnen Ergebnisse zeigt Tabelle II.

Tabelle II

Wanderungsgeschwindigkeit von Erythrozyten unter Einwirkung von Neuraminidase unterschiedlicher Verdünnung

Versuchsdatum	Chargen-Nummer	Verfallsdatum	Geschwindigkeit v bei N'ase Verdünnung von:					
			1/10	1/50	1/100	1/1000	1/5000	1/10000
28.1.70	I.	21.10.69			0.328	0.720		0.950
					0.394	0.710		0.930
15.2.70	II.	20.3.70			0.710	0.830	0.880	0.965
24.2.70							0.900	
13.4.70							0.942	
14.4.70							0.930	
20.4.70					0.656	0.772	0.995	
							0.989	
23.4.70	III.	30.9.70	0.400		0.809	0.977	1.062	
29.4.70				0.410				
30.4.70				0.470				
				0.445				
21.5.70			0.345	0.385	0.590			
22.5.70					0.472			
23.5.70					0.450			
28.5.70					0.698			

C. Abspaltung von NANA in Abhängigkeit von Neuraminidasekonzentration und fermentierter Erythrozytenmenge

Wir hatten die Absicht, in den Hauptversuchen unter Anderem auch einen Aufschluß über die Größe der Neuraminsäureabspaltung zu gewinnen. Dazu war es notwendig, zunächst festzustellen, in welchen Konzentrationen die Erythrozytensuspensionen gehalten werden mußten, um abgespaltene NANA mit der Thiobarbitursäuremethode noch sicher nachweisen zu können.

Wir legten eine Versuchsreihe an, in der steigenden Erythrozytenkonzentrationen Neuraminidase in zwei verschiedenen Verdünnungen und zwei verschiedenen Volumina zugesetzt wurde. Es wurde sodann parallel die Änderung der elektrophoretischen Geschwindigkeit der suspendierten Zellen und aus den Überständen die abgespaltene NANA-Menge bestimmt.

Versuchsprotokoll

Frisch gewonnene, in Puffer suspendierte, Erythrozyten wurden dreimal in phys. Kochsalzlösung gewaschen. Vom Sediment wurden mittels Blutzuckerpipette bestimmte Volumina entnommen und in vorbereitete Reagenzgläser, enthaltend jeweils 0,5 ml phys. NaCl, verbracht. Ebenfalls frisch zubereitete Neuraminidaseverdünnung von 1/50 und 1/100 wurden in Mengen von 0,1 ml und 0,2 ml dazuge-

geben. Einzelheiten siehe Tabelle III. Die Reaktionsgemische wurden 30 Minuten bei 23° C aufbewahrt. Anschließend wurden die Überstände zur Neuraminsäurebestimmung entfernt, die Zellen in Puffer aufgeschwemmt und elektrophoretisch untersucht.

Tabelle III

Einfluß der Neuraminidasekonzentration und der fermentierten Substratkonzentration auf die Menge der abgespaltenen NANA.

Ansatz I

NaCl	ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Erysed.	ml	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
N'ase 1/50	ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Geschw. v		0.522	0.516	0.524	0.500	0.507
Ext.bei 549mμ		0.067	0.155	0.235	0.274	0.310
NANA μg		1.5	2.6	5.2	6.1	6.9

Ansatz II

NaCl	ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Erysed.	ml	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
N'ase 1/50	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Geschw. v		0.536	0.524	0.553	0.604	0.726
Ext.bei 549mμ		0.062	0.122	0.182	0.233	
NANA μg		1.4	2.7	4.0	5.2	

Ansatz III

NaCL	ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Erysed.	ml	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
N'ase 1/100	ml	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Geschw. v.		0.488	0.486	0.532	0.540	0.634
Ext.bei 549	mμ	0.127	0.163	0.218	0.283	0.290
NANA	μg	2.8	3.6	4.8	6.3	6.4

Ansatz IV

NaCL	ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Erysed.	ml	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2
N'ase 1/100	ml	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Geschw. v.		0.408	0.493	0.564	0.800	
Ext.bei 549	mμ	0.062	0.087	0.164	0.190	
NANA	μg	1.4	1.9	3.6	4.2	

Die NANA-Mengen in μg wurden unter Verwendung unseres mol. Extinktionskoeffizienten von 69.4 errechnet.

Bei diesem Versuch war mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen (Erythrozytensuspensionen) und variablen Fermentmengen (Neuraminidaseverdünnungen) gearbeitet worden. Um eine einheitliche, vergleichbare Basis für die Auswertung zu erhalten, setzten wir als Bezugseinheit für die kleinste verwendete Substratmenge 0.01 ml Erythrozytensediment fest (Substrateinheit). Die Mengen der zugeführten Neuraminidase und die Mengen der abgespaltenen NANA wurden nach Maßgabe der Werte von Tabelle III rechnerisch in Relation zu

dieser Substrateinheit gebracht. Somit galten als Dimensionen: für Neuraminidase IE/Substrateinheit 0.01 , für NANA µg/Substrateinheit 0.01 . Die Zusammenstellung der Umrechnungsergebnisse zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

Umrechnung der zugeführten Neuraminidasekonzentration und der abgespaltenen NANA-Menge auf die Substrateinheit 0.01 ml Erythrozytensediment.

Neuraminidase 1/50 = 10 IE/ml; Neuraminidase 1/100 = 5 IE/ml

Ansatz I

Erysed.	ml	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
N'ase 1/50 IE		2.0	1.0	0.4	0.2	0.1
NANA	µg	1.5	1.3	1.04	0.61	0.34

Ansatz II

Erysed.	ml	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
N'ase 1/50 IE		1.0	0.5	0.2	0.1	0.05
NANA	µg	1.4	1.35	0.8	0.52	

Ansatz III

Erysed.	ml	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
N'ase 1/100IE		1.0	0.5	0.2	0.1	0.05
NANA	µg	2.8	1.8	0.96	0.63	0.32

Ansatz IV

Erysed.	ml	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
N'ase	IE	0.5	0.25	0.1	0.05	0.025
NANA	µg	1.4	0.95	0.72	0.42	

1.) Einfluß der Neuraminidasekonzentration auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Humanerythrozyten

In drei Ansätzen (II - IV) konnte nachgewiesen werden, daß eine Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der zugesetzten Neuraminidasekonzentration besteht. Steigende Neuraminidasekonzentrationen bewirken steigende Verlangsamung der Zellgeschwindigkeit. Dies gilt nach unseren Versuchen in einem gewissen Bereich geringerer Neuraminidasekonzentrationen. In Ansatz I konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden, allerdings war hier der Bereich des größten Geschwindigkeitsabfalls nicht mit-erfaßt worden. (Abb.3)

2.) Einfluß der Neuraminidasekonzentration auf die Menge der abgespaltenen NANA

In allen vier Ansätzen konnte eine Abhängigkeit der abgespaltenen NANA-Menge von der zugeführten Neuraminidasekonzentration festgestellt werden. Bei gleicher Substratkonzentration (Substrateinheit 0.01) wurde durch steigende Neuraminidasekonzentrationen steigende Mengen von NANA abgespalten. (Abb. 4)

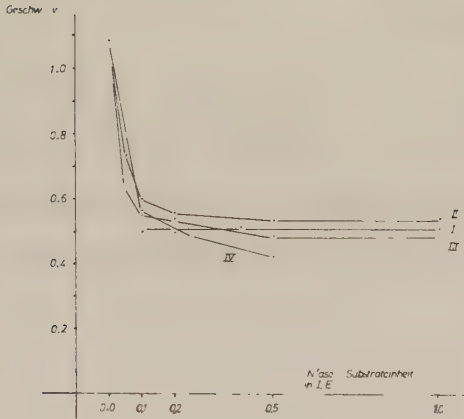


Abb. 3: Wanderungsgeschwindigkeit von Humanerythrozyten in Abhängigkeit von der Neuraminidasekonzentration (Tabelle III und IV)

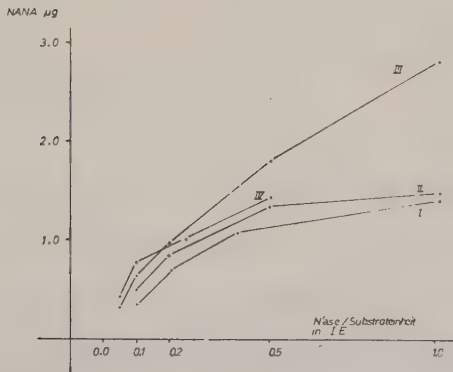


Abb. 4: Abgespaltene NANA-Mengen in Abhängigkeit von der Neuraminidasekonzentration (Tabelle III und IV)

3) Einfluß der Substratkonzentration auf die Menge der abgespaltenen NANA

Es konnte weiter gezeigt werden, daß die absolute Menge der abgespaltenen NANA abhängig ist von der Substratkonzentration. Von steigenden Mengen Erythrozyten-sediment werden bei konstanter Neuraminidasekonzentration steigende Mengen von NANA abgespalten (Tabelle III). und Abb.5).

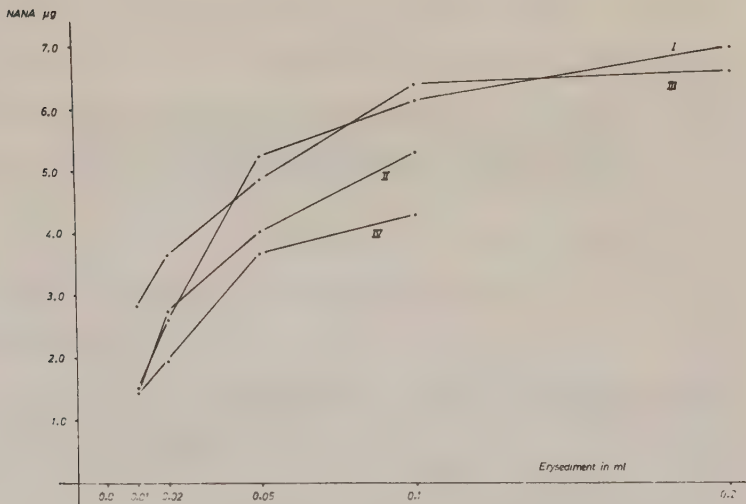


Abb. 5: Abgespaltene NANA-Mengen in Abhängigkeit von der Substratmenge bei konstanter Neuraminidasekonzentration (Tabelle III)

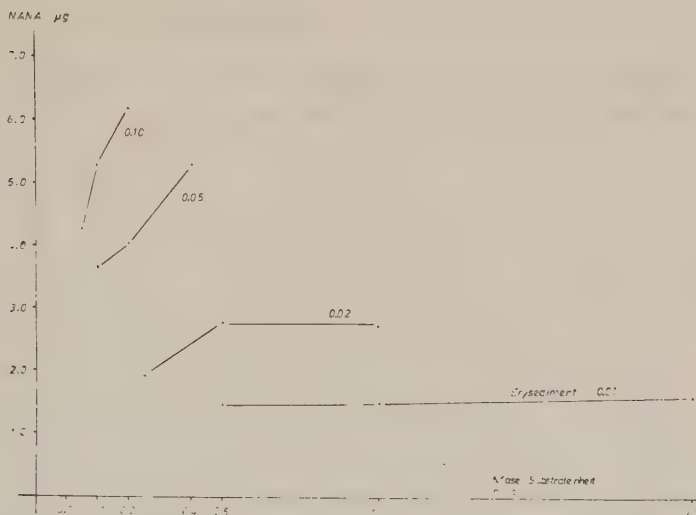


Abb. 6: Abgespaltene NANA-Mengen in Abhängigkeit von der Substratmenge und der Neuraminidasekonzentration pro Substrateinheit 0.01 (Tabelle III und IV; Abs. 3. u. 4.)

4.) Verminderung der Zellwanderungsgeschwindigkeit in Relation zur Menge der abgespaltenen NANA

Die Abbildungen 7 bis 10 zeigen, daß der Verminderung der Zellwanderungsgeschwindigkeit eine Zunahme der abgespaltenen NANA-Menge gegenübersteht. Untersucht man jedoch den Kurvenverlauf, so ergibt sich, daß der Abfall der Geschwindigkeitskurve dem Anstieg der NANA-Kurve nicht entspricht. Während die Geschwindigkeitskurve exponentiell abfällt und die Endgeschwindigkeit der Zellen bereits im Anfangsteil der Kurve nahezu erreicht ist, fehlt der NANA-

Kurve ein entsprechend steiler Anstieg. Dies zeigt, daß die Zellverlangsamung zumindest Quantitativ nicht mit NANA-Abspaltung erklärt werden kann.

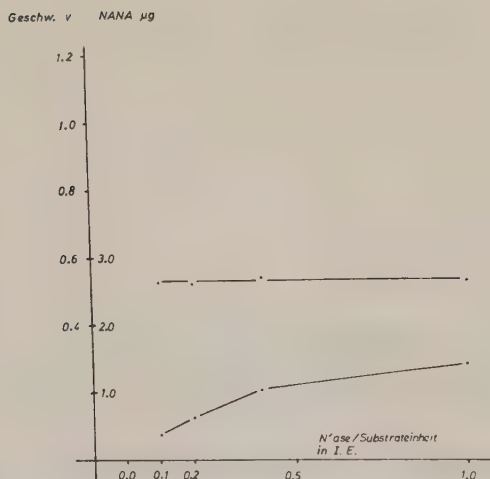


Abb. 7: Zellverlangsamung in Relation zur abgespaltenen NANA-Menge (Tabelle III und IV; Ansatz I)

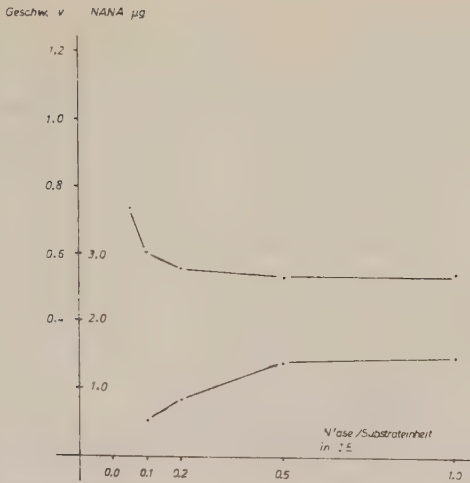


Abb. 8: Zellverlangsamung in Relation zur abgespaltenen NANA-Menge (Tabelle III und IV; Ansatz II)

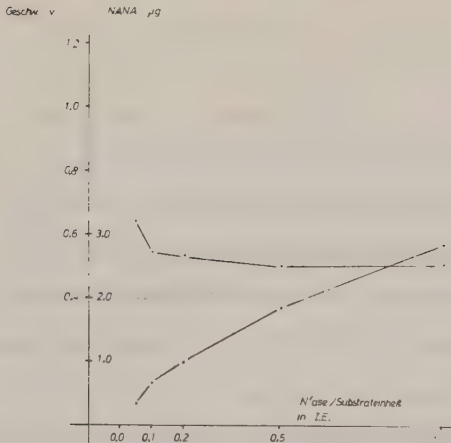


Abb. 9: Zellverlangsamung in Relation zur abgespaltenen NANA-Menge (Tabelle III und IV; Ansatz III)

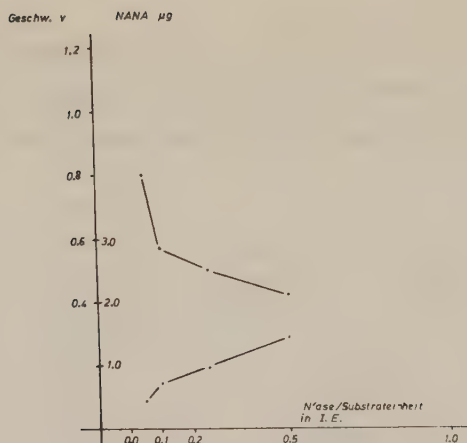


Abb. 10: Zellverlangsamung in Relation zur abgespaltenen NANA-Menge (Tabelle III und IV; Ansatz IV)

Teil II: Hauptversuche

Die Absicht der Hauptversuche lag darin, zu prüfen, welcherart die Wirkung unserer speziellen Seren auf die Verlangsamung neuraminidasebehandelter Erythrozyten war, bzw. festzustellen, ob durch eine Art Inaktivierung der Neuraminidase eine Verlangsamung normaler Zellen verhindert wurde.

Es standen uns zur Prüfung insgesamt 6 Seren zur Verfügung, die wir durch Immunisierung von Kaninchen mittels i.v. Injektion von verschiedenen Neuraminidasekonzentration erhalten hatten (s. Kapitel: Material und Methoden).

Tabelle V

Serumbezeichnung	Immunisierungsdosis
K 8	75 E N'ase/pro dosi
K 8	150 E N'ase/p.d.
K 9	150 E N'ase/p.d.
K 10	250 E N'ase/p.d.
K 12	250 E N'ase/p.d.
K 13	500 E N'ase/p.d.

Unsere Versuche gliederten sich in zwei prinzipielle Versuchsanordnungen:

- 1.) Sollte das schon in der Einleitung skizzierte Experiment ausgeführt werden: der Nachweis von Enzym (RDE) am Erythrozyten. Hierzu war nach der Reaktion Zelle-Enzym das Antiserum gegen das Enzym in den Versuchsansatz einzubringen.
- 2.) Sollte in einer Art Gegenprobe die spezifische Wirksamkeit der Antiseren geprüft werden. Hierzu wurden⁴ erst Enzym und Anti-Enzym zur Reaktion gebracht und erst später als Indikatoren der Enzymaktivität Substrat, also Erythrozyten hinzugefügt.

Die anfallenden Überstände der Reaktionsgemische wurden in einem dritten Versuchsgang mit der Thiobarbitursäuremethode auf etwaigen Gehalt an abgespaltener Neuraminsäure geprüft.

Im einzelnen gingen wir folgendermaßen vor:

A. Wirkungen von Anti-RDE auf RDE-behandelte Erythrozyten

1. Versuchsanordnung

a. Material:

Erysediment aus frisch gewonnenen, 3mal in phys.

NaCL gewaschenen Humanerythrozyten

Neuraminidase (Charge II), Verdünnung 1 : 5000

Seren K 2, K 8, K 9, K 10, K 12, K 13

b. Versuchsgang:

Aus dem Erysediment wurde durch Verdünnen mit Puffer eine 20% Erythrozytensuspension hergestellt. Jeweils 3ml der Suspension wurden mit dem doppelten Volumen Neuraminidase (1 : 5000) versetzt und bei 23° C 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3mal in phys. Kochsalzlösung gewaschen - wobei der Überstand (ca. 8 ml) zum späteren NANA-Nachweis abgehoben und eingefroren wurde - und mit Puffer auf ein Volumen von 10 ml (entsprechend einer 6% Suspension) aufgefüllt. Aus 1 ml dieser Suspensionslösung wurde anschließend die elektrophoretische Beweglichkeit der suspendierten Zellen geprüft, um das Ausmaß der Verlangsamung zu ermitteln.

Von den Seren stellten wir eine halbschlächtige Verdünnungsreihe folgendermaßen her:

Insgesamt 8 bzw. 12 Reagenzgläser wurden je Glas mit 0.5 ml Puffer bestückt. Das erste Glas jeder Reihe erhielt zusätzlich 0.5 ml Serum. Durch Hin- und Hersaugen mittels der Pipette wurden Puffer und Serum gut vermischt. Von diesem Gemisch pipettierten wir

0,5 ml in das folgende Reagenzglas über, wo es mit dem darin enthaltenen Puffer in der vorigen Weise vermischt wurde. Von dieser Mischung wurden wieder 0,5 ml in das folgende Glas überpipettiert und so fort. Die aus dem letzten Glas anfallenden 0,5 ml Mischung wurden verworfen.

Mit dieser Methodik erhielten wir eine Serumverdünnungsreihe von:

1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, bzw. 1/512, 1/1024, 1/2048 und 1/4096.

Zu jeder Serumverdünnungsstufe wurden nun 0,5 ml der 6% Suspension neuraminidasebehandelter Erythrozyten gegeben. Diese Reaktionsgemische inkubierten wir ebenfalls bei 23° C. Nach 2 Stunden wurde der Agglutinationstiter abgelesen. Sofort anschließend entfernten wir durch Dekantieren die Überstände und froren sie zum späteren Neuraminsäurenachweis in der Tiefkühltruhe bei - 25° C ein. Die Zellagglutinate schwemmten wir wieder in Puffer auf und prüften sie in der Elektrophoreseapparatur. Ein wiederholtes Waschen der Zellen konnte entfallen, da ein Einfluß geringerer Serumkonzentrationen auf die Beweglichkeit nicht zu erwarten war (SACHTLEBEN (20)).

2. Versuchsprotokolle und Ergebnisse

a. Versuch 1

Prüfung der Seren K 9 und K 10, jeweils 8 Verdünnungsstufen Neuraminidase 1/5000 (Charge II)

Zum Neuraminsäurenachweis eingefroren:

Überstand der neuraminidaseversetzten Erysuspension (8 ml).

Je 8 Überstände aus den Reaktionsgemischen (je 1 ml), Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle VI

	Kontroll- Erys	Serumverdünnungen					
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
						Serum K 9	
Geschw. v.	0.895	0.540		0.566	0.640		
						Serum K 10	
Geschw. v.	0.895	1.083	1.073	1.069	0.975	0.949	0.900
NANA ug	1.52	3.24	2.88	2.17	1.95	1.26	1.06

Agglutinationstiter: Serum K 9 : 1 : 64

Serum K 10: 1 : 16

- Ergebnis: 1. Unter Einwirkung von Serum K 9 wird die bereits bestehende Verlangsamung N'asebehandelter Erythrozyten noch verstärkt.
2. Unter Einwirkung von Serum K 10 wird die Zellverlangsamung durch N'ase bis zu einer Serumverdünnung von 1 : 16 vollständig aufgehoben.
3. Die Meßwerte für abgespaltene NANA-Menge scheinen in direkter Abhängigkeit zur Serumkonzentration zu stehen. Es handelt sich aber um einen unspezifischen Einfluß des Serum, wie später in Versuch Nr. 5 (61) noch dargelegt werden wird. Die unter der Rubrik "Kontroll-Erys" angegebenen NANA-Mengen stammen jedoch aus serumfreien Überständen, so daß die genannten Einschränkungen für diese Meßwerte nicht gelten.

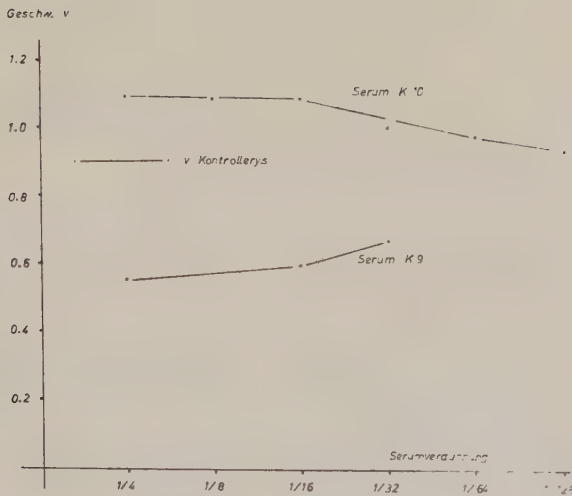


Abb. 11: Änderung der Geschwindigkeit von N'asé fermentierten Erythrozyten unter Einwirkung von Serumverdünnungsreihen K 9 und K 10 (Versuch 1; Tabelle VI).

b. Versuch 2

Prüfung der Seren K 12 und K 13, jeweils 8 Verdünnungsstufen Neuraminidase 1/5000 (Charge II).

Zur Neuraminsäurebestimmung eingefroren:

Überstand der N'ase versetzten Erysuspension (8 ml)

Je 7 Überstände aus den Reaktionsgemischen (je 1 ml)

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle VII

	N'ase Erys	Serumverdünnungen					Serum K 12
		1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Geschw. v	0.910	0.525	0.632	0.912	0.930	0.905	
Geschw. v	0.910	1.072	1.040	1.005	0.919	0.920	Serum K 13 0.907
NANA µg	1.54	1.43	1.22	0.97	0.82	0.85	0.72

Agglutinationstiter: Serum K 12 1 : 32
Serum K 13 1 : 16

- Ergebnis: 1. Unter Einwirkung von Serum K 12 wird ebenfalls die Verlangsamung N'ase behandelter Erys verstärkt.
2. Serum K 13 vermag bis zu einer Verdünnung von 1/4 die bestehende Verlangsamung der Zellen rückgängig zu machen.
3. Direkte Abhängigkeit der abgespaltenen NANA-Menge von der Serumkonzentration (s. Seite 55).

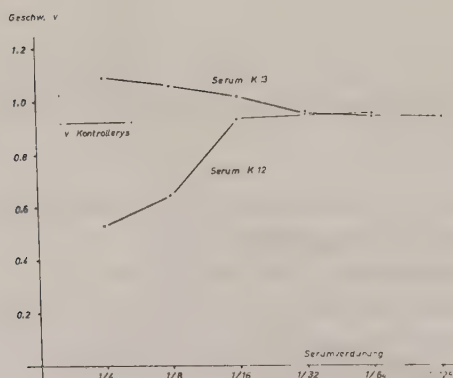


Abb. 12: Änderung der Geschwindigkeit N'ase behandelter Erythrozyten unter Einwirkung von Serumverdünnungsreihen K 12 und K 13 (Versuch 2; Tabelle VII).

c. Versuch 3

Prüfung der Seren K 2 und K 8, jeweils 8 Verdünnungsstufen Neuraminidase 1/5000 (Charge II).

Zur Neuraminsäurebestimmung eingefroren:

Überstand der N'ase versetzten Erysuspension (8 ml)

Je 6 Überstände aus den Reaktionsgemischen (je 1 ml)

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle VIII

	Kontroll- Erys	Serumverdünnungen				Serum K 2 1/64
		1/4	1/8	1/16	1/32	
Geschw. v.	0.930	Keine meßbare Wanderung bei Stromfluß, große Agglutinate, prakt. keine normale Zelle				
						Serum K 8
Geschw. v.	0.930	1.081	1.030	1.012	0.910	0.924
NANA µg/ 0.5 ml	1.58	12.8	7.21	3.62	3.18	3.06

Agglutinationstiter: Serum K 2 1 : 32 sehr feste Agglutinate
Serum K 8 negativ

- Ergebnisse: 1. Unter Einwirkung von Serum K 2 entstanden außerordentlich feste Agglutinate, die bis zu einer Verdünnung von 1/32 makroskopisch nachgewiesen werden konnten. Bei mikroskopischer Betrachtung zeigten sich die Zellen auch noch bei Verdünnung von 1/128 deformiert und z. T. agglutiniert. Während Stromfluß erfolgte keine meßbare Wanderung.
2. Unter Einwirkung von Serum K 8 kann die Verlangsamung der Zellen bis zur Verdünnung 1/4 vollständig rückgängig gemacht werden.

3. Die bei Anwesenheit von Serum K 8 abgespaltenen NANA-Mengen sind unverhältnismäßig hoch und wieder in direkter Abhängigkeit von der Serummenge (s. Seite 55).

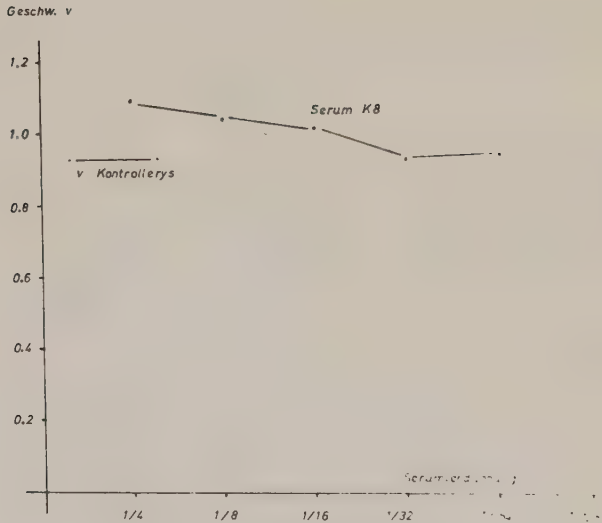


Abb. 13: Wirkung von Serum K 8 auf die Wanderungsgeschwindigkeit N'ase behandelter Erythrozyten.

d. Versuch 4

Nochmalige Überprüfung der Seren K 2, K 9, K 12

Je 12 Verdünnungsstufen bis 1/4096

Neuraminidase Charge III (1/100)

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle IX

	Kontroll- Erys	Serumverdünnungen					Serum K 2	
		1/32	1/64	1/256	1/512	1/024	1/2048	1/4096
Geschw. v.	0.590			0.375	0.466	0.495	0.553	0.589
Geschw. v.	0.590	0.397	0.474	0.539		0.565	Serum K 9	0.594
Geschw. v.	0.590	0.385	0.393	0.400	0.464	0.510	Serum K 12	0.592

Agglutinationstiter: Serum K 2 1 : 64

Serum K 9 1 : 64

Serum K 12 1 : 64

Ergebnisse: Wegen der starken Agglutination konnten die höheren Serumkonzentrationen nicht elektrophoretisch gemessen werden. Berücksichtigt man die in diesem Versuch niedrigere Ausgangsgeschwindigkeit N'ase behandelter Erythrozyten, so wurden die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche bestätigt. Auch hier erfolgte eine weitere Verlangsamung der Zellen unter Einfluß der Seren.

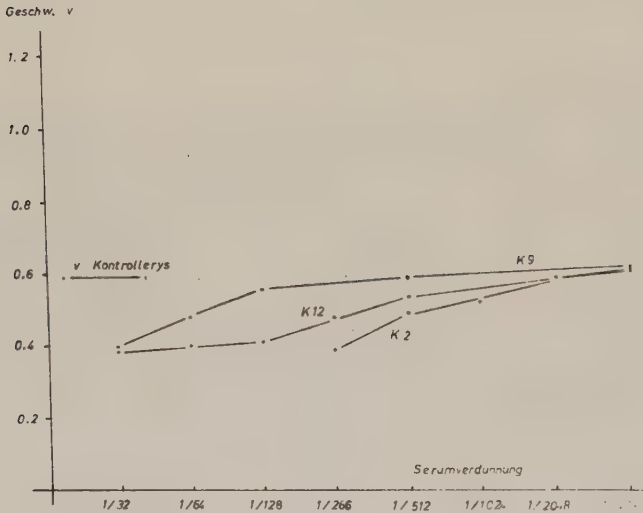


Abb. 14: Wirkung der Seren K 2, K 9, K 12 auf die Wanderungsgeschwindigkeit N'ase behandelter Erythrozyten (Tabelle IX)

e. Versuch 5

Wir hatten in unseren Versuchen Überstände der Reaktionsgemische zur Prüfung auf ihren NANA-Gehalt eingefroren. Die NANA-Bestimmung erfolgte nach Abschluß der Versuche an allen Proben gleichzeitig. Die Werte, die wir dabei in den serumhaltigen Überständen fanden, (teilweise

bei Versuch 1 und 3 angegeben) mußten aufgrund verschiedener Kriterien als falsch angesehen werden:

1. Die absolute Höhe der einzelnen NANA-Mengen war mit den gewählten Versuchsbedingungen nicht zu vereinbaren, insbesondere im Vergleich mit dem NANA-Gehalt der Überstände von Kontroll-Erys.
2. Die direkte Abhängigkeit der NANA-Menge von der Konzentration des Serums, da sie anders kaum erklärt werden konnte, legte den Schluß nahe, daß das Serum selbst im Versuchsgang der Thiobarbitursäuremethode zu ausgeprägten Extinktionen führte, und damit eine Addition der Extinktionen Grundlage der Berechnung der NANA-Menge wurde.

Um diese Fehlerquelle auszuschalten wiederholten wir den Versuchsansatz mit Serum K 13, wobei jedoch ein gleichartiger Leerversuch angesetzt wurde, in dem statt N'ase behandelter Erythrozyten normale Zellen Verwendung fanden (Versuchsansatz I). Die aus dem Leerversuch stammenden Extinktionen wurden von denen des Hauptversuches subtrahiert. Aus der resultierenden Differenz berechneten wir nach der Formel von L. WARREN (25) die korrigierte NANA-Menge.

In einem weiteren Versuchsansatz (Versuchsansatz II) wurde Serum K 13 durch normales Kaninchenserum ersetzt bei sonst gleichem Versuchsgang. Auch hierbei erstellten wir einen Leerversuch und bestimmten die NANA-Menge in den Überständen.

Versuchsansatz I:

1. Hauptversuch: Verdünnungsreihe Serum K 13 mit N'ase behandelten Erys (N'ase 1 : 100 Charge III) 2 Stunden inkubiert.

2. Leerversuch: Verdünnungsreihe Serum K 13 mit Normalerythrozyten 2 Stunden inkubiert.

Versuchsansatz II:

1. Hauptversuch: Verdünnungsreihe von normalem Kaninchenserum mit N'ase behandelten Erys
(N'ase 1 : 100, Charge III) 2 Stunden inkubiert.
2. Leerversuch: Verdünnungsreihe von normalem Kaninchenserum mit Normalerythrozyten 2 Stunden inkubiert.

Je Versuch 7 Verdünnungsstufen bis 1/128

Zur NANA-Bestimmung eingefroren:

Überstand der N'ase versetzten Erysuspension (8 ml)

Je 7 Überstände aus den Reaktionsgemischen (je 1 ml)

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle X

Versuchsansatz I:

<u>Hauptversuch</u>	N'ase	Serumverdünnungen						
	Erys	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Geschw. v	0.698	0.799	0.818	0.826	0.830	0.791	0.723	0.695
<u>Leerversuch</u>								
Geschw. v		1.082	1.078		1.080	1.079	1.081	
Resultierende NANA in µg	2.8	0.016	0.017	0.009	0.041	0.008	0.016	0.041
<u>Versuchsansatz II:</u>								
<u>Hauptversuch</u>								
Geschw. v	0.698	0.699	0.688	0.701	0.688	0.703	0.709	0.698
<u>Leerversuch</u>								
Geschw. v		1.082	1.078	1.079	1.081	1.080		
Resultierende NANA in µg	2.8	0.074	0.057	0.065	0.074	0.082	0.074	0.074

Tabelle XI und XII geben den genauen Gang der NANA-Berechnung wieder:

Tabelle XI Versuchsansatz I

	Serum- verdünnung	E 549	E 532	E 549	E 532	NANA*
Hauptversuch	1/2	0.119	0.148			
Leerversuch		0.118	0.147	0.001	0.001	0.0164
Hauptversuch	1/4	0.084	0.102			
Leerversuch		0.082	0.098	0.002	0.004	0.0167
Hauptversuch	1/8	0.072	0.081			
Leerversuch		0.070	0.076	0.002	0.005	0.0086
Hauptversuch	1/16	0.062	0.072			
Leerversuch		0.059	0.068	0.003	0.004	0.0411
Hauptversuch	1/32	0.056	0.058			
Leerversuch		0.055	0.056	0.001	0.002	0.0083
Hauptversuch	1/64	0.047	0.048			
Leerversuch		0.046	0.047	0.001	0.001	0.0164
Hauptversuch	1/128	0.043	0.048			
Leerversuch		0.040	0.044	0.003	0.004	0.0411

Tabelle XII Versuchsansatz II

	Serum- verdünnung	E 549	E 532	E 549	E 532	NANA*
Hauptversuch	1/2	0.069	0.087			
Leerversuch		0.064	0.081	0.005	0.006	0.074
Hauptversuch	1/4	0.062	0.069			
Leerversuch		0.057	0.061	0.005	0.008	0.057
Hauptversuch	1/8	0.060	0.063			
Leerversuch		0.056	0.059	0.004	0.004	0.065
Hauptversuch	1/16	0.057	0.057			
Leerversuch		0.052	0.051	0.005	0.006	0.074
Hauptversuch	1/32	0.054	0.052			
Leerversuch		0.048	0.044	0.006	0.008	0.082
Hauptversuch	1/64	0.048	0.048			
Leerversuch		0.043	0.042	0.005	0.006	0.074
Hauptversuch	1/128	0.048	0.048			
Leerversuch		0.043	0.042	0.005	0.006	0.074

*NANA (pg) in 0.5 ml Probe des Überstandes

Ergebnisse: 1. Versuchsansatz I

- a. Unter Einwirkung von Serum K 13 kommt es zwar nicht zur Normalisierung der Zellgeschwindigkeit aber immerhin zu einer deutlichen Anhebung. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der vorausgegangenen Versuche überein, wenn man die geringere Ausgangsgeschwindigkeit (0.698) dieser Versuchsanordnung berücksichtigt. Im Leerversuch zeigt sich erwartungsgemäß Normalgeschwindigkeit der Zellen.
- b. Die unter Berücksichtigung des Leerwertes errechnete NANA-Menge zeigt im Gegensatz zu früheren Versuchen keine Abhängigkeit von der Serumkonzentration mehr. Die absoluten Konzentrationen sind so gering, daß sie in den Bereich des allgemeinen Versuchsfehlers fallen, so daß bei den gewählten Versuchsbedingungen eine NANA-Abspaltung unwahrscheinlich scheint.

2. Versuchsansatz II

- a. Unter Einwirkung von normalem Kaninchenserum wird die verminderte Geschwindigkeit N'ase behandelter Erythrozyten nicht beeinflußt. Auch die normale Zellgeschwindigkeit im Leerversuch wird nicht verändert.
- b. Für die Neuraminsäure gilt das oben gesagte.

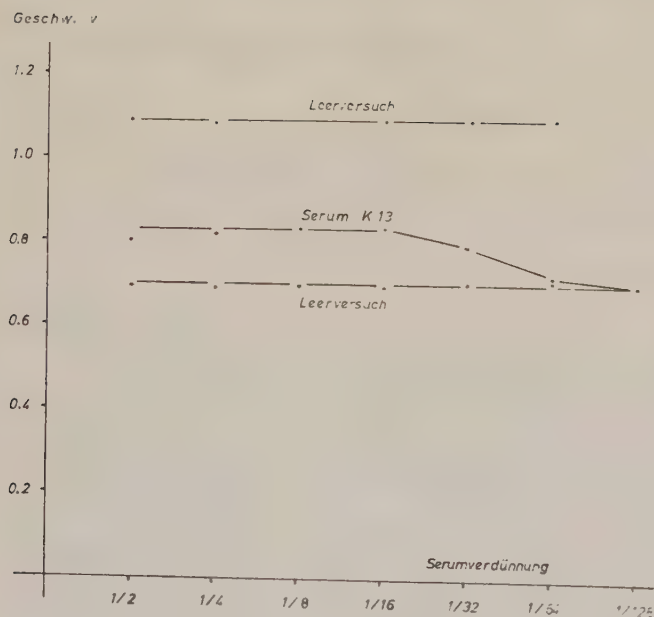


Abb. 15: Wirkung von Serum K 13 auf die Wanderungsgeschwindigkeit von N'ase behandelten Erythrozyten im Vergleich mit normalem Kaninchenserum (Tabelle X).

B. Die Wirkung von Anti-RDE auf gelöste RDE

1. Versuchsanordnung

a. Material:

Neuraminidase (Charge II) Verdünnung 1 : 5000,

Charge III 1 : 50 u. 1 : 100

Seren K 2, K 8, K 9, K 10, K 12, K 13

Erysediment aus frisch gewonnenen, 3mal in phys.

Kochsalzlösung gewaschenen Erythrozyten.

b. Versuchsgang:

Durch Verdünnen mit Puffer wurden die gewünschten Neuraminidasekonzentrationen eingestellt. Von jedem Serum stellten wir eine halbschlächtige Verdünnungsreihe her, die 5 bis 7 Stufen enthielt. Dabei wurde jedes Reagenzglas mit jeweils 0,5 ml Neuraminidaseverdünnung bestückt, sodann wurde dem 1. Röhrchen 0,5 ml Serum zugefügt und durch Hin- und Hersaugen mittels einer Pipette gemischt. 0,5 ml dieser Mischung wurden in das nächste Reagenzglas überpipettiert und erneut gemischt. In gleicher Weise wurden mit den folgenden Röhrchen verfahren, 0,5 ml aus dem letzten Röhrchen wurden verworfen. Diese Verdünnungsreihe inkubierten wir bei 23° C 1/2 h. Aus dem Erysediment stellten wir mit Puffer eine 6% Suspension her, von der jedes Reagenzglas der Verdünnungsreihe 0,5 ml erhielt. Diese Reaktionsgemische inkubierten wir erneut für 2 h bei 23° C. Im Anschluß daran wurden die Überstände durch dekantieren entfernt und zur späteren Bestimmung der abgespaltenen NANA bei -25° C eingefroren.

Nach Abschluß der Inkubationszeit lasen wir den Agglutinationstiter ab. Die Zellagglutinate schwemmten wir wieder in Puffer auf und prüften die Geschwindigkeit in der Elektrophoreseapparatur.

Kontrolle: 1 ml 20% Erysuspension wurde mit der doppelten Menge N'aseverdünnung versetzt und 1/2 h bei 23° C inkubiert. Anschließend froren wir den Überstand zur NANA-Bestimmung ein.

Nach dreimaligem Waschen in phys. NaCl schwemmten wir die Zellen in Puffer auf und bestimmten die elektrophoretische Ausgangsgeschwindigkeit N'ase behandelter Erythrozyten.

2. Versuchsprotokolle und Ergebnisse

Versuch 6

Prüfung der Seren K 2 und K 9

Je 5 Verdünnungsstufen bis 1/32

Neuraminidase Charge II 1/5000

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle XIII

	Kontroll- Erys	Serumverdünnungen				
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
		Serum K 2				
Geschw. v.	0.989	bei Stromfluß keine meßbare Wanderung				
		Serum K 9				
Geschw. v.	0.989	--	--	0.424	0.699	0.785

Agglutinationstiter: Serum K 2 1 : 32

Serum K 9 1 : 16

Ergebnisse: 1. Unter Einwirkung von Serum K 2 kam es zur Bildung sehr fester Agglutinate, die trotz Aufschüttelns in Puffer in den vorhandenen Konzentrationen bis 1/32 keine meßbare elektrophoretische Wanderung zeigten. Dies galt ebenso für die beiden ersten Verdünnungsstufen von Serum K 9. In den weiteren

Stufen zeigt sich eine ganz deutliche Verlangsamung gegenüber dem Ausgangswert der Kontrollerythrozyten.

2. Entsprechende NANA-Mengen sind nicht mehr angegeben, da wegen des Fehlens eines Leerversuches für sie die Einschränkungen bei Versuch 5 gelten.

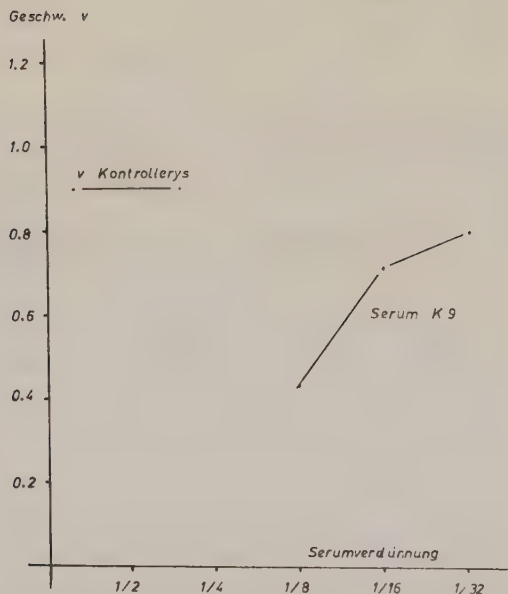


Abb. 16: Einfluß von N'ase, die mit Serum K 9 inkubiert war, auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Normalerythrozyten (Versuch 6, Tabelle XIII).

Versuch 7

Prüfung der Seren K 8 und K 10

Je 7 Verdünnungsstufen bis 1/128

Neuraminidase Charge III Verdünnung 1 : 50

Versuchsgang wie oben angegeben

Tabelle XIV

	N'ase Erys	Serum K 8						
		Serumverdünnungen						
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Geschw. v	0.410	1.100	1.080	1.065	1.010	0.550	0.400	0.422
						Serum K 10		
Geschw. v	0.410	1.080	1.078	1.032	0.920	0.528	0.415	0.408

Agglutinationstiter: Serum K 8 1 : 64

Serum K 10 1 : 128

Ergebnisse: Unter Einwirkung beider Seren bis Verdünnung 1/4 normale Beweglichkeitswerte. Dies spricht für vollständige Hemmung der Neuraminidase. Bei Verdünnung 1/64 ist die elektrophoretische Wirkung der Seren abgeklungen.

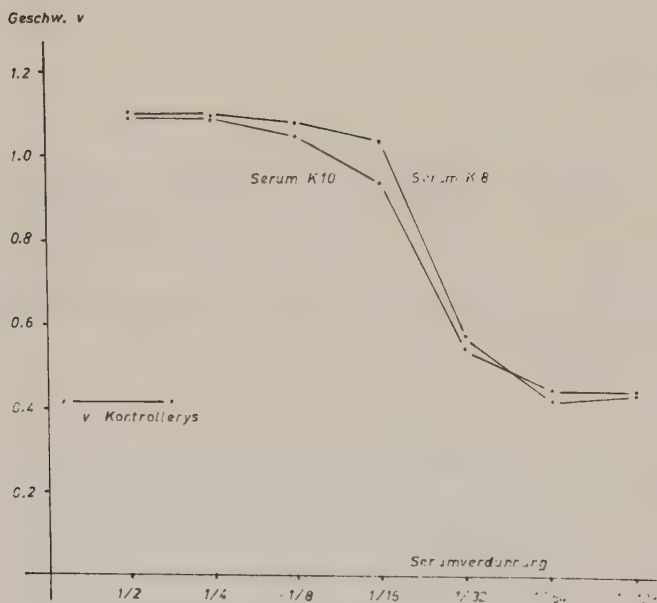


Abb. 17: Einfluß von N'ase, die mit Serum K 8 und K 10 inkubiert war, auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Normalerythrozyten (Versuch 7, Tabelle XIV).

Versuch 8

Prüfung der Seren K 12 und K 13

Je 7 Verdünnungsstufen bis 1/128

Neuraminidase Charge III Verdünnung 1 : 50

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle XV

	Kontroll- Erys	Serum K 12						
		Serumverdünnungen						
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Geschw. v.	0.425	Keine meßbare Wanderung bei Stromfluß						
		Serum K 13						
		1.070	1.078	1.055	1.045	0.924	0.785	0.442
Geschw. v.	0.425	1.070	1.078	1.055	1.045	0.924	0.785	0.442

Agglutinationstiter: Serum K 12 1 : 64

Serum K 13 1 : 8

Ergebnisse: Unter Einwirkung von Serum K 12 kommt es zu starker Agglutination. In den hohen Serumkonzentrationen ist überhaupt keine Bewegung bei Stromfluß meßbar, in den niederen Konzentrationen finden sich vereinzelt Zellen mit Geschwindigkeiten zwischen 0.500 und 0.400, die Mehrzahl der Zellen reagiert jedoch nicht auf Stromfluß.

Unter Einwirkung von Serum K 13 gelingt die Hemmung der Neuraminidase bis zu Serum-Verdünnung 1/4. Die Hemmwirkung des Serums ist bei Verdünnung 1/128 weitgehend abgeklungen.

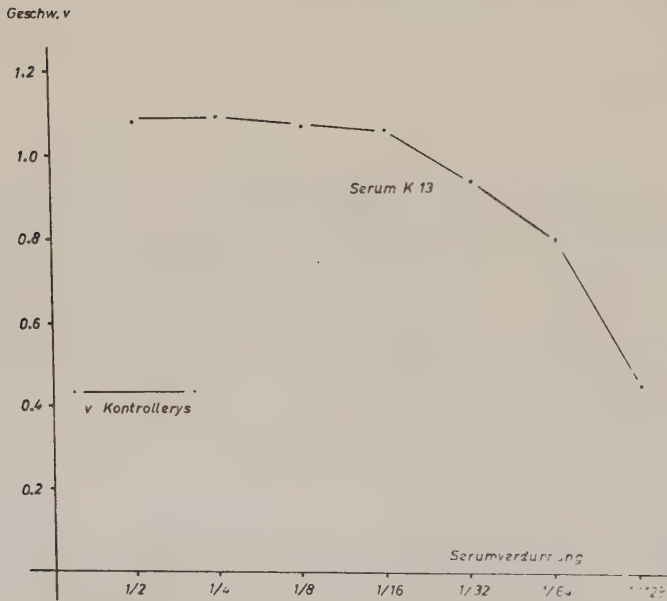


Abb. 18: Wirkung von N'ase, die mit K 13 inkubiert war, auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Normalerythrozyten (Versuch 8, Tabelle XV).

Versuch 9

In Analogie zu Versuch 5 führten wir auch in dieser Versuchsanordnung einen Versuch zur Ermittlung der abgespaltenen NANA-Mengen in Relation zur Konzentration von Serum K 13 durch. Zur Korrektur der Extinktionsverfälschung durch Serum diente der entsprechende Leerversuch, dessen Extinktionswerte von denen des Hauptversuches abgezogen wurden.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde Serum K 13 durch normales Kaninchenserum ersetzt und ebenfalls ein Leerversuch erstellt.

Versuchsansatz I

1. Hauptversuch: Verdünnungsreihe Serum K 13 mit N'ase (1/100) 1/2 h inkubiert, dann Zugabe von Normalerys.
2. Leerversuch : Verdünnungsreihe Serum K 13 mit Puffer 1/2 h inkubiert, dann Zugabe von Normalerys.

Versuchsansatz II

1. Hauptversuch: Verdünnungsreihe von normalem Kaninchenserum mit N'ase 1/2 h inkubiert, dann Zugabe von Normalerys
2. Leerversuch : Verdünnungsreihe von normalem Kaninchenserum mit Puffer 1/2 h inkubiert, dann Zugabe von Normalerys.

Je Versuch 7 Verdünnungsstufen bis 1/128.

Neuraminidase Charge III Verdünnung 1 : 100

Zur NANA-Bestimmung eingefroren:

Überstand der N'ase besetzten Kontrollerys (8 ml)

Je 7 Überstände aus den Reaktionsgemischen (je 1 ml)

Versuchsgang wie oben angegeben.

Tabelle XVI Versuchsansatz I

	Serum- Verd.	E 549	E 532	ΔE 549	ΔE 532	NANA*
Hauptversuch	1/2	0.129	0.155			
Leerversuch		0.120	0.148	0.009	0.007	0.163
Hauptversuch	1/4	0.105	0.113			
Leerversuch		0.093	0.104	0.012	0.009	0.220
Hauptversuch	1/8	0.086	0.085			
Leerversuch		0.072	0.076	0.014	0.009	0.269
Hauptversuch	1/16	0.076	0.070			
Leerversuch		0.061	0.059	0.015	0.011	0.278
Hauptversuch	1/32	0.071	0.064			
Leerversuch		0.054	0.050	0.017	0.014	0.302
Hauptversuch	1/64	0.073	0.065			
Leerversuch		0.052	0.048	0.021	0.017	0.376
Hauptversuch	1/128	0.079	0.067			
Leerversuch		0.044	0.047	0.035	0.020	0.693

NANA* (in 0,5 ml Probe korrigiert in μg)

Tabelle XVII Zusammenfassung der Ergebnisse von Versuch 9

Versuchsansatz I

	Kontroll- Erys	Serumverdünnungen						
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
Hauptv.v.	0.450	1.079	1.082	1.075	1.082	1.065	0.899	0.583
Leerv. v.		1.079	1.079	1.080	1.080	1.072	1.077	1.080
NANA in µg	5.89	0.16	0.22	0.27	0.28	0.30	0.38	0.69

Versuchsansatz II

Hauptv.v.	0.450	0.516	0.490	0.466	0.466	0.464	0.465	0.464
Leerv. v.		1.095	1.090	1.084	1.078	1.080	1.079	1.081

Ergebnisse: 1. Versuchsansatz I

- a. Unter Einwirkung von Serum K 13 wird die Neuraminidase so gehemmt, daß sie bis zu Serumkonzentrationen von 1/16 Normalerythrozyten nicht zu verlangsamten vermag. Die Wirksamkeit des Serums ist bei Konzentration von 1/128 noch nicht vollständig abgeklungen.
- b. Die angegebenen NANA-Mengen waren in jeweils 0.5 ml Probe enthalten. Es zeigte sich, daß die Menge der abgespaltenen NANA sich umgekehrt proportional zum Serumhemmeffekt verhielt, mit abnehmender Serumwirksamkeit steigt die Menge der abgespaltenen NANA.

2. Versuchsansatz II

- a. Eine Hemmung der Neuraminidase durch normales Kaninchenserum ist nicht festzustellen, die Geschwindigkeitsanhebung in den beiden ersten Verdünnungsstufen beruht auf einem unspezifischen Serumeffekt, wie der entsprechende Leerversuch deutlich macht.
- b. Wegen aufgetretener Hämolyse konnte keine NANA-Bestimmung durchgeführt werden.

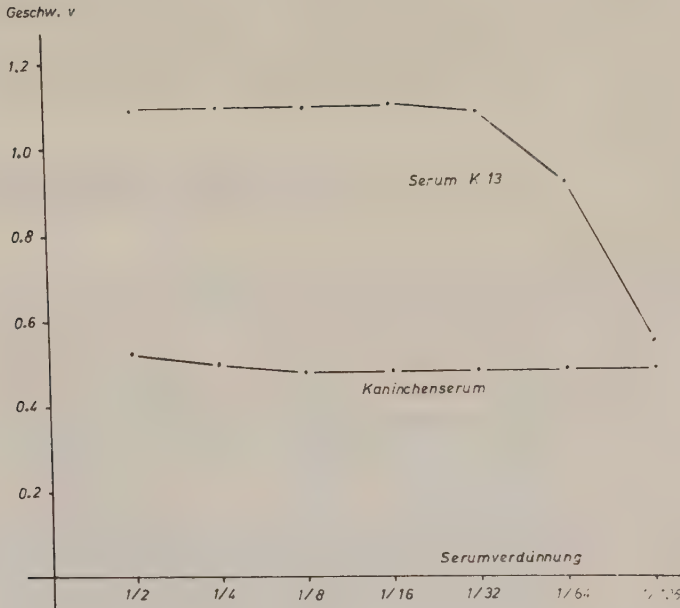


Abb. 19: Wirkung von Neuraminidase, die mit Serum K 13 inkubiert war, auf die Wanderungsgeschwindigkeit von Normalerythrozyten. Im Vergleich dazu die Wirkung von Neuraminidase nach Inkubation mit normalem Kaninchenserum (Versuch Nr. 9, Versuchsansatz I 1.) und II 1.), Tabelle XVII)

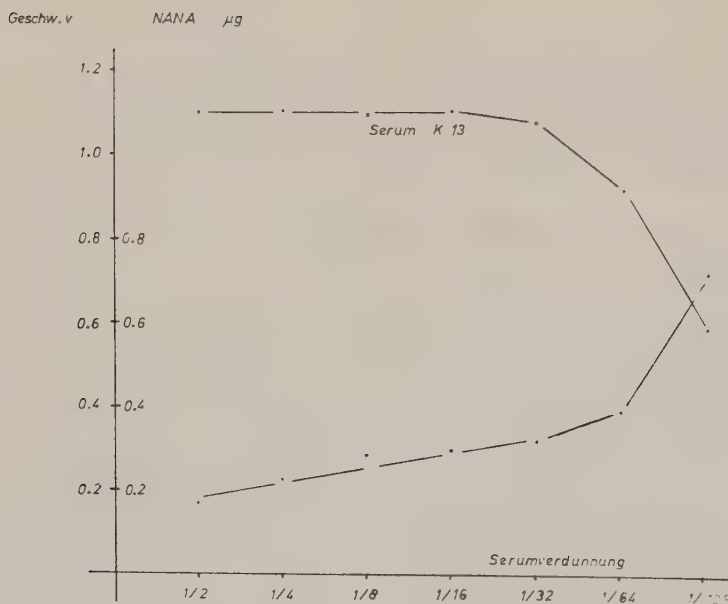


Abb. 20: Wanderungsgeschwindigkeit von Humanerythrozyten unter Einwirkung von Neuraminidase, die mit Serum K 13 inkubiert war. Im Vergleich dazu die Menge der abgespaltenen Neuraminsäure (Versuch 9, Versuchsansatz I, Tabelle XVI und XVII)

IV. Diskussion

Die Fragestellung dieser Arbeit, wie wir sie am Schluß der Einleitung formulierten, lautete: ist die Minderung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Erythrozyten unter der Einwirkung von RDE ursächlich hervorgerufen durch die Abspaltung von Neuraminsäure oder beruht sie auf einem anderen Mechanismus, wie dem von STRAUB und SACHTLEBEN diskutierten Überdecken von Elementarladungen durch adsorbierte RDE-Partikel, wobei der Abspaltung von Neuraminsäure keine elektrokinetische Bedeutung zukäme. Dieser Problemstellung gemäß sollen die Ergebnisse unserer Versuche analysiert werden.

Im Rahmen der Vorversuche ergaben sich drei wesentliche Tatsachen:

1. Steigende Mengen Ferment bewirken zunehmende Verlangsamung der Erythrozyten. Die Verminderung der Wanderungsgeschwindigkeit ist also abhängig von der Dosis der zugeführten Neuraminidase.
2. Die Menge der abgespaltenen Neuraminsäure ist ebenfalls direkt abhängig von der einwirkenden Neuraminidasekonzentration. Die absolute Größe der Neuraminsäuremenge ist dabei eine Funktion der fermentierten Substratmenge.
3. Betrachtet man die graphischen Darstellungen Nr. 7-10, auf denen die Zellgeschwindigkeit und abgespaltenen NANA-Mengen in Relation zur je Substrateinheit 0,01 zugeführten Neuraminidasemenge dargestellt sind, so lassen sich auch über die Beziehung zwischen abgespaltenener NANA-Menge und Abfall der Zellgeschwindigkeit Aussagen machen:

während die Geschwindigkeitskurve einen exponentiellen Abfall zeigt, und die Endgeschwindigkeit der Zellen nahezu bei Neuraminidasekonzentrationen von 0,2 IE/0,01 Substrat erreicht ist, erfolgt der Anstieg der NANA-Kurve relativ flach und kontinuierlich, wobei in keinem Kurvenabschnitt ausgeprägtere Steigungsunterschiede auftreten.

Diese Ergebnisse zeigen einerseits für Neuraminidase die gleichen Gegebenheiten, wie sie schon für RDE nachgewiesen worden sind. Damit genügt auch Neuraminidase nicht den klassischen Kriterien eines Fermentes. Zum Anderen zeigt das Kurvenverhalten der Neuraminsäure unmittelbar, daß die Menge der abgespaltenen NANA nicht in direkter Beziehung zur Zellbeweglichkeit steht. Es muß somit angenommen werden, daß die Verminderung der Zellbeweglichkeit quantitativ nicht mit Neuraminsäureabspaltung erklärt werden kann. Dies bedeutet, daß die Abspaltung von NANA und damit die Abspaltung von negativen Elementarladungen nicht ausschließlich entscheidend ist für die Verringerung des Zelloberflächenpotentials. Danach muß nunmehr die überragende Bedeutung der NANA bei der Bildung des Zelloberflächenpotentials bezweifelt werden. Zum Anderen stellt sich die Frage, ob die Verminderung des Zellpotentials überhaupt durch eine Abspaltung von Elementarladungen zustande kommt.

Wenn wir eine Abspaltung von Ladungen annehmen, so kann hierfür NANA ausschließlich nicht infrage kommen, vielmehr muß ein anderer Ladungsträger postuliert werden. Ein solcher ist unseres Wissens jedoch nicht bekannt.

Wesentlich wahrscheinlicher ist daher die Annahme, daß in den Vorgängen, die zur Zellverlangsamung führen, auch andere Mechanismen von Bedeutung sind. Eine Klärung hierzu können die Ergebnisse der Hauptversuche geben.

In den beschriebenen Versuchsanordnungen konnten wir im Wesentlichen folgende Feststellungen machen:

Die Verlangsamung von Erythrozyten, die mit Neuraminidase fermentiert wurden, konnte durch die Einwirkung spezieller Seren aufgehoben und bis zu bestimmten Serumverdünnungen Normalgeschwindigkeit wiederhergestellt werden.

Da bei Verwendung von normalem Kaninchenserum dieser Effekt nicht auftritt, darf man annehmen, daß es sich hierbei um eine spezifische Wirkung dieser Seren handelt.

Wie unter "Material und Methoden" beschrieben, wurden die Seren durch Immunisierung von Kaninchen mit verschiedenen Neuraminidasekonzentrationen gewonnen, sie stellen damit Seren dar, die gegen das Fermentprotein Neuraminidase Antikörper gebildet haben. Der beschriebene Effekt muß demnach auf eine spezielle Wechselwirkung zwischen Neuraminidase und seinem spezifischen Antikörper zurückzuführen sein.

Bei der Prüfung einer gewissen Menge der verschiedensten Antiseren, die mit der Erythrozytenoberfläche in Reaktion treten, hat SACHTLEBEN (20) durchweg festgestellt, daß hierdurch eine Verlangsamung der Zellbeweglichkeit entsteht. Eine Erhöhung der Beweglichkeit muß deshalb andere Ursachen haben.

Eine Bindung von Anti-Neuraminidase an die Zellwand könnte nur über sein spezifisches Antigen, also über Neuraminidasemoleküle erfolgen. Da die Antiseren einen eindeutigen Effekt auf die Zellbeweglichkeit ausüben, muß also eine spezifische Reaktion an der Zelle stattgefunden haben. Sie kann somit nur an Neuraminidasemolekülen erfolgt sein, die noch an der Zellwand adsorbiert waren.

Wie auch unsere Vorversuche ergaben, ist die Abspaltung von Neuraminsäure keinesfalls die einzige Ursache der Verminderung der Zellbeweglichkeit. Als zweiten Mechanismus haben SACHTLEBEN und STRAUB (23) aufgrund eingehender Versuche mit Virus und RDE die sogenannte Abdeckung nachgewiesen. Bei diesem Mechanismus werden elektrokinetisch wirksame Ladungen der Zelloberfläche durch Überlagerung unwirksam. Die Überlagerung erfolgt durch Moleküle oder Partikel (Viren) mit relativ geringer Oberflächenladung. Derselbe Mechanismus spielt bei allen Antiseren, die mit dem Erythrozyten reagieren, eine Rolle.

Würde demnach das überlagernde Agens wieder von der Zelle entfernt, so müßte sie ihre Beweglichkeit wieder erhöhen. Dies ist bei Blutgruppenantiseren durch Abspaltung schon gefunden worden (SACHTLEBEN (21)). Dasselbe ist aber auch in unseren Versuchen der Fall. Wir sehen deshalb in den Resultaten eine Bestätigung der Überlagerungstheorie, (die inzwischen in England anschaulicher als "umbrellatheorie" bezeichnet wird).

Demnach wäre die Ladungsverminderung durch Neuraminidase deshalb eingetreten, weil diese Moleküle am Ery-

throzyten adsorbiert geblieben sind. Die darauf folgende Ladungserhöhung durch Neuraminidaseantiseren wäre entstanden, weil durch die Bildung des Immunkomplexes Neuraminidase - Antineuraminidase eine Elution des gesamten Gebildes von der Zellwand erfolgte. Die überlagerten Strukturen, einschließlich ihrer Ladungen, sind demnach wieder frei und - wie das zell-elektrophoretische Ergebnis zeigt - wirksam bei einer normalen Zelle.

Die relativ starke Wirkung relativ geringer abdecken-der Partikelzahlen ist - bei Untersuchungen mit Virus - darauf zurückgeführt worden, daß es auf der Zelloberfläche Gebiete hoher Ladungsdichte geben muß. Andere Gebiete mit relativ niedriger Ladungsdichte lassen sich ebenfalls experimentell wahrscheinlich machen (SACHTLEBEN (21)). In den Gebieten hoher Ladungsdichte ist Neuraminsäure, der Rezeptor für Neuraminidase, in hoher Konzentration nachgewiesen worden (Sa. Topologie).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zeigen somit,

1. Es befindet sich am fermentierten Erythrozyten Neuraminidase adsorbiert.
2. Die Verminderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Zellen ist mindestens teilweise durch diese Überlagerung hervorgerufen, nicht aber durch eigentliche enzymatische Abspaltung von Neuraminsäure.

In dieser Diskussion haben wir, wenn es sich um die Adsorption an den Erythrozyten handelte, der Über-

sichtigkeit halber nur von Neuraminidase gesprochen. Das Fermentpräparat wird vom Hersteller zwar weitgehend, aber nicht vollständig gereinigt geliefert. Es ist somit denkbar, daß auch anderes, darin enthaltenes Material an die Zellwand adsorbiert wird. Da dieses aber auch in dem Antigen, das für die Immunisierung der Kaninchen verwendet worden war, enthalten ist, kann sich auch hiergegen Antikörper gebildet haben. Dieser würde dann ebenfalls zur Ablösung seines spezifischen Antigenpartikels geführt haben. Es ändert sich also an der Betrachtung nichts Grundsätzliches.

V Zusammenfassung

Durch Immunisierung von Kaninchen mit Neuraminidase wurden Antiseren hergestellt. Mit diesen konnte Neuraminidase vollständig gehemmt werden. Erythrozyten, die mit Neuraminidase behandelt worden waren, zeigten den bekannten Effekt einer Verminderung ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit. Durch Zugabe von Neuraminidase-Antiseren konnte die Wanderungsgeschwindigkeit wieder erhöht werden.

In parallel geführten Ansätzen waren die Mengen an jeweils freigesetzter Neuraminsäure bestimmt worden.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Verminderung der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit nicht nur auf Abspaltung von Neuraminsäure beruhen kann, wie heute häufig angenommen wird. Als weiterer Mechanismus kommt die Abdeckung fixer Ladungen durch adsorbierte Fermentmoleküle hinzu.

VI Literaturverzeichnis

1. ADA, G.L. an STONE, J.D.: Nature (London) 165, 189-190
2. AMINOFF, D.: Methods for the Quantitative Estimation of N-Acetylneuraminic Acid and their Application to Hydrolysates of Sialomucoids. Biochem. J. 81, 384-392 (1961)
3. BURNET, F.M., McCREA, J.F. and STONE, J.D.: Brit. J.exp. Path. 27, 228 (1946)
4. BURNET, F.M. and STONE, J.D.: Austral. J. exp. Biol.med. Sci. 25, 227 (1947)
5. BUZELL, A. and HANIG, M.: Mechanism of hemagglutination by influenza virus. Advances in Virus Research V, 289-346 (1958)
6. COOK, G., HEARD, D.H. and SEAMAN, G.V.F.: Nature 191, 44-47 (1961)
7. FUHRMANN, G.F., GRANZER, E., KÜBLER, W., RUEFF, F. und RUHENSTROTH-BAUER, G.: Neuraminsäurebedingte Strukturunterschiede der Zellmembranen normaler und maligner Leberzellen. Zeitschr. Naturforschg. 17 b, 610-613 (1962)
8. HANIG, M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 68, 385-392 (1948)
9. HIRST, G.: Science 94, 22 (1941)
10. HIRST, G.: J. Exp. Med. 87, 301-314, 315-328 (1948)
11. HIRST, G.: J. Exp. Med. 89, 223-232
233-243 (1949)
12. KLENK, E., FAILLARD, H., LEMPFRID, H.: Über die enzymatische Wirkung von Influenzavirus. Hoppe-Seylers Zeitschr. Physiol.Chem. 301, 235-246 (1955)

13. KLENK, E. and STOFFEL, W.: Z. physiol. Chem. 303,78 (1956)
14. KLENK, E. and LEMPFRIED, H.: Z. physiol. Chem. 307, 278 (1957)
15. KLENK, E. and UHLENBRUCK, G.: Z. physiol. Chem. 311, 227 (1958)
16. MANTEL, W.: Med. Diss. Homburg (1968)
17. PIPER, W.: Untersuchungen über die Wirkung des "Receptor Destroying Enzyme" auf menschliche Erythrocyten. Acta Haemat. Basel 18, 414,428 (1957)
18. RUHENSTROTH-BAUER, G., FUHRMANN, G.F., KÜBLER, W., RUEFF, F. und MUNK, M.: Zur Bedeutung der Neuraminsäuren in der Zellmembran für das Wachstum maligner Zellen, Zeitschr. für Krebsforschung 65, 37-43 (1962)
19. SACHTLEBEN, P. und STRAUB, E.: Z. ges. exp. Med. 131, 493 (1959)
20. SACHTLEBEN, P.: Die elektrische Oberflächenladung roter Blutzellen und ihre Beziehung zum Phänomen der Agglutination. Ann. Univ. Saraviensis 9, 243-368 (1962)
21. SACHTLEBEN, P.: Topologie der Erythrozytenoberfläche, Hämatologie und Bluttransfusion 8, 126-128, München 1969
22. STRAUB, E.: Med. Diss. München 1961
23. STRAUB, E. und SACHTLEBEN, P.: Das elektrokinetische Potential von Hühnererythrozyten unter RDE-Einwirkung, I. Mitt.: Vergleichende Untersuchung der Wirkungskinetik von RDE und Myxovirus, Zeitschr Naturf., Bd. 18 b, Heft 7, 1963
24. STRAUB, E. und SACHTLEBEN, P.: Das elektrokinetische Potential von Hühnererythrozyten unter RDE-Einwirkung, II. Mitt.: Das quantitative Verhältnis zwischen adsorbierter und freier RDE-Phase; Zeitschrift Naturf., Bd. 18 b, Heft 7, 1963
25. WARREN, L.: J. Biol. Chem. 234, 1971 (1959)

Herrn Professor Dr.med. J. B. MAYER, Direktor der Kinderklinik der Universität des Saarlandes, möchte ich meinen Dank aussprechen für die Arbeitsmöglichkeit in den Laboratorien seiner Klinik und für sein Interesse.

Herrn Privatdozent Dr.med. P. SACHTLEBEN bin ich für die Überlassung des Themas und seine stets wohlwollende Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Fräulein Schwarz danke ich für ihre technische Assistenz.

LEBENS LAUF

Am 27. Januar 1944 wurde ich als Sohn des Dr.med. Wilhelm Gsell und seiner Ehefrau Maria, geb.Prenzlau in Grätz/Posen geboren. Mein Vater fiel als Stabsarzt 1944 in Rußland.

Zu Beginn des Jahres 1945 mußte meine Mutter mit mir flüchten. Nach vorübergehenden Aufenthalten in Tübingen und Erlangen zog meine Mutter nach Freising/Oberbayern.

In Freising besuchte ich von 1950 bis 1954 die Grundschule, von 1954 bis 1963 war ich Schüler des Humanistischen Gymnasiums in Freising, wo ich im Juli 1963 das Zeugnis der Reife erhielt.

Im November 1963 begann ich mit dem Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen, wo ich 1964 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1966 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Im Herbst 1966 immatrikulierte ich mich an der Universität des Saarlandes. Hier bat ich im Sommersemester 1967 Herrn Professor Dr.med. Sachtleben um ein experimentelles Thema zur Dissertation.

Am 12. Dezember 1969 bestand ich nach zwölfsemestrigem Studium das medizinische Staatsexamen in Homburg/Saar.

Die Medizinalassistentenzeit leistete ich an der Universitäts-Kinderklinik Homburg, an der Chirurgischen Klinik der Städt. Krankenanstalten Winterberg Saarbrücken und an der Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Saarlouis ab.

Am 31. Januar 1971 wurde mir die Approbation erteilt.

Seit dem 1. März 1971 bin ich als Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik der Städt. Krankenanstalten Winterberg Saarbrücken tätig.

